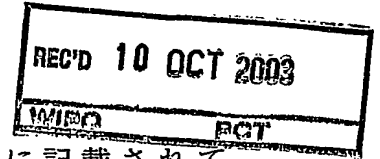


26.08.03

10/525567

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 1月30日

出願番号  
Application Number: 特願2003-022776  
[ST. 10/C]: [JP 2003-022776]

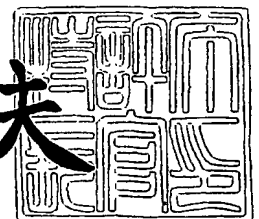
出願人  
Applicant(s): 林原 健

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月26日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 10096102

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 A61P 37/08  
A61K 35/64  
A61K 38/00  
C07K 14/435

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 岡本 岩夫

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 新井 紀恵

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 河野 恵三

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物  
化学研究所内

【氏名】 栗本 雅司

【特許出願人】

【識別番号】 000251141

【住所又は居所】 岡山県岡山市東古松 4 丁目 9 番 8 号

【氏名又は名称】 林原 健

**【先の出願に基づく優先権主張】****【出願番号】** 特願2002-252087**【出願日】** 平成14年 8月29日**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 055985**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 図面 1**【物件名】** 要約書 1**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗アレルギー剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤。

【請求項 2】 有効成分として、単離又は部分精製するか、あるいは人為的に発現させた、配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質を含んでなる請求項 1 に記載の抗アレルギー剤。

【請求項 3】 蛋白質が、抗体又はサイトカインの産生を抑制する生物作用を有し、且つ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が 55,000 乃至 70,000 ダルトンである請求項 2 に記載の抗アレルギー剤。

【請求項 4】 蛋白質が、配列表における配列番号 3 又は 4 のいずれかで示されるアミノ酸配列を有する請求項 2 又は 3 に記載の抗アレルギー剤。

【請求項 5】 蛋白質が、抗アレルギー作用を実質的に失わない範囲で、配列表における配列番号 3 又は 4 におけるアミノ酸の 1 個又は 2 個以上が欠失するか、他のアミノ酸に置換されたもの、あるいは、他のアミノ酸の 1 個又は 2 個以上が挿入、又は付加されたものである請求項 4 に記載の抗アレルギー剤。

【請求項 6】 蛋白質が、配列表における配列番号 5 又は 6 のいずれかで示される塩基配列を有する DNA を人為的に発現させることにより得られる蛋白質である請求項 2 乃至 5 のいずれかに記載の抗アレルギー剤。

【請求項 7】 蛋白質が、コードするアミノ酸配列を変えない範囲で配列表における配列番号 5 又は 6 のいずれかで示される塩基配列に対して 1 個又は 2 個以上の塩基が置換された DNA を人為的に発現させることにより得られる蛋白質である請求項 6 に記載の抗アレルギー剤。

【請求項 8】 蛋白質が、2 mg/ml の蛋白濃度の試料を用いた本明細書記載のサイトカイン産生抑制試験において、蛋白質無添加の場合に対し、インターロイキン 2 の相対産生量を 80% 以下、又は、インターロイキン 4 の相対産生量を 60% 以下まで低下させることを特徴とする請求項 2 乃至 7 のいずれかに記載の抗アレルギー剤。

【請求項 9】 経口抗アトピー用剤としての請求項 1 乃至 8 のいずれかに記載の抗アレルギー剤。

【請求項 10】 請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の抗アレルギー剤を含んでなる飲食物。

【請求項 11】 請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の抗アレルギー剤を含んでなる化粧品。

【請求項 12】 請求項 1 乃至 9 のいずれかに記載の抗アレルギー剤を含んでなる医薬品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗アレルギー剤に関するものであり、より詳細には、有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

【非特許文献 1】 ジェイ・シュミットゾーバ (J. Schmitzova) 等、『セルラー・アンド・モレキュラー・ライフ・サイエンス (Cellular and Molecular Life Sciences)』、第 54 巻、1, 020 頁乃至 1, 030 頁、(1998 年)

【0003】

近年、食生活などの変化に伴って、アレルギー性疾患の罹患者が増加しており、とりわけ、花粉症、アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、接触過敏症などアトピー性疾患の罹患者の増加が問題となっている。従来、アレルギー性疾患の治療においては、抗ヒスタミン剤やステロイド剤などの薬剤が対症療法的に投与されているけれども、これらの薬剤は長期連用による副作用が大きいという問題があった。このような状況に鑑み、アレルギー疾患における諸症状を効果的に緩和することができ、かつ、日常生活に支障をきたすことなく、長期連用し得る治療手段が望まれていた。

## 【0004】

一方、最近、ローヤルゼリーに様々な生理活性のあることが認められ、健康食品としての関心が高まっている。ローヤルゼリーは、周知のとおり、ミツバチの巣における王台（女王バチの房）に蓄積された、働きバチの外分泌腺からの乳白色の分泌物であり、女王バチとなるべき幼虫に与えられる餌であると言われている。ローヤルゼリーの化学的組成は生産地や季節などにより、多少の差違はあるものの、水分65～75%、蛋白質15～20%、炭水化物10～15%、脂肪1.7～6%、灰分0.7～2%含むとされている。非特許文献1において、ジェイ・シュミットゾーバ（J. Schmitzova）等は、ローヤルゼリーに含有される5種類の主要な蛋白質（major royal jelly protein）のcDNAをミツバチ（Apis mellifera）よりクローン化し、それらの遺伝子配列、推定アミノ酸配列を明らかにして、これら蛋白質をMRJP1、MRJP2、MRJP3、MRJP4、及びMRJP5とそれぞれ命名している。しかしながら、これら蛋白質の生理活性に関しては何ら記載されていない。

## 【0005】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、諸種のアレルギー疾患へ適用すると、重篤な副作用を惹起することなく、アレルギー疾患に伴う諸症状を効果的に緩和する手段を提供することを課題とするものである。

## 【0006】

## 【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決する目的で、本発明者がローヤルゼリーに着目し、鋭意研究したところ、ローヤルゼリーに含まれる低分子又は高分子のある種の成分、具体的には例えば、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質が、抗体及び／又はサイトカインの産生を著明に抑制することが判明し、生体内においては、重篤な副作用を惹起することなくアレルギー疾患に伴う諸症状を効果的に緩和することを確認した。

## 【0007】

即ち、本発明は、有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤を提供することによって、上記の課題を解決するものである。

#### 【0008】

さらに、本発明は、上記の抗アレルギー剤を含んでなる飲食物を提供することによって、上記の課題を解決するものである。

#### 【0009】

さらに、本発明は、上記の抗アレルギー剤を含んでなる化粧品を提供することによって、上記の課題を解決するものである。

#### 【0010】

さらに、本発明は、上記の抗アレルギー剤を含んでなる医薬品を提供することによって、上記の課題を解決するものである。

#### 【0011】

##### 【発明の実施の形態】

本発明は、有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤に関するものである。本発明に用いるローヤルゼリーを分泌するミツバチとしては、例えば、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*)、トウヨウミツバチ (*Apis cerana*)、オオミツバチ (*Apis dorsata*)、コミツバチ (*Apis florea*) などが、また、産地としては、日本、南米、北米、豪州、中国、欧州などが挙げられる。これらのローヤルゼリーは、それが、抗アレルギー作用を有する低分子又は高分子の成分、例えば、配列表における配列番号 1 又は 2 のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質を含有し、未加工のままか、あるいは精製した上で、ヒトをはじめとする哺乳類に適用したときに、アトピー性アレルギー、組織特異性アレルギー、免疫複合体型アレルギー、遅延型アレルギーなどのアレルギー性疾患の治療、予防に効果を発揮するものである限り、ミツバチの種類、産地、形態、純度、調製方法にかかわらず、有利に用いることができる。

#### 【0012】

抗アレルギー剤の用途にもよるけれども、ローヤルゼリーの抗アレルギー作用

が弱い場合には、低分子又は高分子の生理活性物質を精製するための方法を適用して精製する。本発明でいう精製ローヤルゼリーとは、天然のローヤルゼリーに含まれる成分の一部を精製により部分的に除き、且つ、着目する成分の固形物当たりの含有量を高めたものを意味する。個々の精製方法としては、例えば、濾過、濃縮、乾燥、遠心分離、分別沈澱、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などが挙げられ、必要に応じて、これらは組み合わせて適用される。

### 【0013】

本発明で用いるローヤルゼリーにおける抗アレルギー成分の具体例としては、例えば、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質が挙げられる。本発明でいう蛋白質とは、それが配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有し、且つ、生体内において抗アレルギー作用を発揮するものであるかぎり、その純度、由来、調製方法は問わない。好ましい蛋白質としては、例えば、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有し、且つ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分子量が55,000乃至70,000ダルトンであって、生物作用として抗体及び／又はサイトカインの産生を抑制するものが挙げられる。より好ましい蛋白質としては、例えば配列表における配列番号3又は4に示すアミノ酸配列を有するものが挙げられ、斯かるアミノ酸配列を有する蛋白質はいずれも生体において抗体及びサイトカイン産生抑制が顕著であり、しかも長期連用しても重篤な副作用を惹起することなく、アレルギー疾患に伴う諸症状を効果的に緩和するので、この発明において極めて有用である。なお、これらの蛋白質は単なる例であって、本発明でいう蛋白質は決してこれらに限定されてはならず、例えば、抗アレルギー作用を実質的に失わない範囲で配列表における配列番号3又は4のいずれかの全アミノ酸配列において、これらアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上が欠失、又は他のアミノ酸で置換されるか、あるいは、配列番号3又は配列番号4



のアミノ酸配列に、他のアミノ酸が1個又は2個以上挿入又は付加されたアミノ酸配列を有するものであってもよいことは言うまでもない。

#### 【0014】

本発明に用いる配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する抗アレルギー蛋白質は、本来、ローヤルゼリーに含有される蛋白質であり、通常、天然のローヤルゼリーから採取することにより得ることができる。本発明に用いる抗アレルギー蛋白質をローヤルゼリーを原料として精製する場合には、前記、ローヤルゼリーの精製で述べた各種方法の1又は複数を適宜用いればよく、これにより所望のレベルにまで精製された本発明で用いる抗アレルギー蛋白質を得ることができる。本発明でいう単離若しくは部分精製された配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質とは、このような各種精製方法を用いて完全に精製・単離されたもの若しくは部分的に精製されたものを意味し、いずれも有利に用いることができる。

#### 【0015】

本発明の抗アレルギー剤の有効成分である、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質は、通常、電気泳動により分子量を測定するなどして識別・定量することができる。電気泳動の方法としては、特に制限はないものの、通常、還元剤存在下でのSDS-PAGEが用いられる。還元剤存在下でのSDS-PAGEは、ユウ・ケイ・レムリ(U. K. Laemmli)の方法(『ネイチャー(Nature)』、第227巻、680頁乃至685頁(1970年))で行うことができる。ローヤルゼリー中に存在する配列表における配列番号1の部分アミノ酸配列を有する蛋白質は、還元剤存在下でのSDS-PAGEにおいて分子量約70キロダルトン(kDa)のものが主であり、一部、約55kDaのものが存在する。また、ローヤルゼリー中に存在する配列表における配列番号2の部分アミノ酸配列を有する蛋白質について、同様に還元剤存在下でのSDS-PAGEにて分子量を測定すると、約55kDaである。非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動やゲルろ過クロマトグラフィーを識別・定量に用いることもできるものの、上記の蛋白質は非変性条件下においては、単量体のみならず、3量体、6量体などの多量体を形成する場合が

あるため、還元剤存在下での SDS-PAGE を用いるのが望ましい。以下、本明細書では、配列表における配列番号 1 の部分アミノ酸配列を有する蛋白質の内、配列表における配列番号 3 のアミノ酸配列を有し、且つ、約 70 kDa の分子量を有する蛋白質を活性蛋白質 1-2 又は「RJP70」と、また、配列番号 2 の部分アミノ酸配列を有する蛋白質の内、配列表における配列番号 4 のアミノ酸配列を有し、且つ、約 55 kDa の分子量を有する蛋白質を活性蛋白質 2 又は「RJP55」と呼称することがある。

#### 【0016】

前述したように、本発明に用いる抗アレルギー蛋白質 RJP70 は配列表における配列番号 3 の、また、RJP55 は配列表における配列番号 4 のアミノ酸配列をそれぞれ有している。これらのアミノ酸配列を非特許文献 1 に報告されているローヤルゼリーの主要蛋白質 MRJP1、MRJP2、MRJP3、MRJP4、及び MRJP5 のアミノ酸配列と比較したところ、RJP70 の N 末端アミノ酸配列は MRJP3 の N 末端アミノ酸配列と、また、RJP55 の N 末端アミノ酸配列は MRJP1 の N 末端アミノ酸配列と完全に一致していた。更に、MRJP3 としては分子量 60、63、66、70 kDa と、分子量が異なる複数の蛋白質が存在していることが報告されており、本発明に用いる配列表における配列番号 1 の部分アミノ酸配列を有する蛋白質にも分子量約 70 kDa の蛋白質（RJP70）だけでなく、同一の部分アミノ酸配列を有し、約 55 kDa の分子量を示す蛋白質が認められている。また、RJP55 は N 末端アミノ酸配列のみならず、分子量においても約 55 kDa と、MRJP1 と一致している。従って、本発明に用いる RJP70 及び RJP55 はそれぞれ MRJP3 及び MRJP1 と実質的に同一である可能性が高い。しかしながら、ジェイ・シュミットゾーバーらは、MRJP1 及び MRJP3 がローヤルゼリー蛋白質のそれぞれ約 31 質量%、約 26 質量% を占めることを報告してはいるものの、これら蛋白質の生物作用に関しては何ら開示も示唆すらしておらず、上記蛋白質が抗アレルギー作用を有することは全く知られていなかった。

#### 【0017】

一方、天然のローヤルゼリーからの採取だけでなく、本発明に用いる抗アレルギー

ギー蛋白質は、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAを用い、組換えDNA技術を適用することによって、実質的に同一の蛋白質を調製することもでき、前記ミツバチはDNAの給源として有利に用いることができる。本発明でいう抗アレルギー蛋白質RJP70又はRJP55をコードするDNAの具体例としては、配列表における配列番号5又は6の塩基配列を有するDNAをそれぞれ挙げることができる。RJP70及びRJP55と実質的に同一であるMRJP3及びMRJP1については、各遺伝子の塩基配列とコードされているアミノ酸配列が既に報告され、遺伝子データベース『ジェンバンク (GenBank)』に登録されており、それぞれアクセッション番号Z26318, AF000633にて閲覧することができる。ジェンバンクに登録されている、MRJP3の塩基配列とコードされているアミノ酸配列を配列表における配列番号7 (成熟型蛋白のN末端アミノ酸はジェイ・シュミットゾーバらの前述の論文に基づきアラニン (Ala) とした。) に、また、MRJP1について同様に配列番号8に示す。これらの情報に基づいて、RJP70又はRJP55をコードする配列表における配列番号5又は6のいずれかの塩基配列を有するDNAは、通常、セイヨウミツバチのメッセンジャーRNA (mRNA) のcDNAとして単離することができる。斯かるDNAは、通常、配列表における配列番号5又は6の塩基配列に示すように、その5'末端に付加された開始コドン及び3'末端に付加された終始コドンを含んでいる。

#### 【0018】

セイヨウミツバチからクローン化したRJP70及びRJP55をコードするDNAの塩基配列 (配列表における配列番号5及び6) 及び該配列がコードするアミノ酸配列 (配列表における配列番号3及び4) を、既に報告されているMRJP3及びMRJP1のものと比較すると、RJP55をコードするDNAの塩基配列及びコードされるRJP55のアミノ酸配列はMRJP1のものと塩基配列の1塩基 (MRJP1をコードする塩基配列である配列表における配列番号8の1134番目の塩基は不明とされているが、RJP55をコードする塩基配列の該当箇所はチミン「t」である) を除いて完全に一致している。一方、RJP

70をコードするDNAの塩基配列は計5塩基がMRJP3のものと異なり、この相違に起因してコードされるRJP70のアミノ酸配列も計3残基が異なっている。RJP70とMRJP3との相違点を表1に示す。

【0019】

【表1】

	番号	蛋白質	
		RJP70	MRJP3
塩基配列 相違位置*	770	G	A
	819	C	T
	820	T	C
	821	C	T
	861	G	C
アミノ酸配列 相違位置**	237	Cys	Tyr
	254	Ser	Leu
	267	Arg	Ser

\* 開始コドン ATG の A を 1 とした。

\*\* RJP70 のアミノ酸番号で表し、N末端アミノ酸の Ala を 1 とした。

【0020】

配列表における配列番号5又は6のいずれかに示す塩基配列は本発明のDNAの塩基配列の単なる例であって、本発明に用いるDNAは配列番号5又は6のいずれかに示す塩基配列の全部を含むものに限定されず、当該塩基配列の一部を含み、且つ、配列表における配列番号1又は2のいずれかの部分アミノ酸配列を有する本発明の抗アレルギー蛋白質をコードするものである限り包含される。なお、部位特異的変異などの慣用の組換えDNA技術を適用し、斯かるDNAに塩基の欠失、置換、挿入及び／又は付加を導入することにより、斯かるDNAが本来的にコードする蛋白質の抗アレルギー作用を実質的に消失しない範囲内で当該蛋白質に1個又は2個以上のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入及び／又は付加を導入してアミノ酸配列を改変することも有利に実施できる。アミノ酸配列の改変は、抗アレルギー活性を有する蛋白質RJP70とRJP55のアミノ酸レベルでの相同性が約66%であることから、全体の65%までにとどめるのが望ましい。

【0021】

配列表における配列番号 5 又は 6 のいずれかの塩基配列を有する DNA は、本発明の抗アレルギー剤の有効成分である蛋白質を組換え DNA 技術によって製造する場合に、有利に利用できる。これら RJP70 又は RJP55 をコードする配列表における配列番号 5 及び 6 のいずれかの塩基配列を有する DNA を人為的に発現させて、抗アレルギー蛋白質を生成させ、生成した該蛋白質を採取することにより、本発明の抗アレルギー剤の有効成分である抗アレルギー蛋白質を得ることができる。上記の DNA を人為的に発現させるためには、例えば、常法によるイン・ビトロでの DNA の発現（イン・ビトロ転写及びイン・ビトロ翻訳）を利用することも可能であるけれども、適当な宿主細胞を形質転換してなる形質転換体の飼育又は培養により行うのが望ましい。

#### 【0022】

本発明で用いる RJP70 又は RJP55 を組換え DNA 技術を適用して製造する際、用いる形質転換体は、通常、配列表における配列番号 5 又は 6 の塩基配列を有する DNA を、自律複製可能なベクターと連結して組換え DNA とし、この組換え DNA を適宜の宿主に導入することにより得ることができる。自律複製可能なベクターは、宿主の種類に応じて慣用のものから適宜選択すればよく、具体的には pBR322、pUC18、Bluescript II SK (+)、pUB110、pTZ4、pC194、pHV14、TRp7、YEp7、及び pBS7 などのプラスミドベクター、 $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ C、 $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ B、 $\rho$ 11、 $\phi$ 1、及び  $\phi$ 105 などのファージベクターや、pVL1393 などのバキュロウィルスベクターが挙げられる。このうち、本発明の DNA を大腸菌で発現させるには、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、pBR322、Bluescript II SK (+)、 $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ C、及び  $\lambda$ gt $\cdot$  $\lambda$ B などが好適である。一方、枯草菌で発現させるには、pUB110、pTZ4、pC194、 $\rho$ 11、 $\phi$ 1、及び  $\phi$ 105 が好適である。pHV14、TRp7、YEp7、及び pBS7 は、組換え DNA を二種以上の宿主内で複製させる場合に有用である。以上のような自律複製可能なベクターは、通常、プロモーター、エンハンサー、複製起点、転写終結部位、選択配列などの、この発明の DNA が個々の宿主において発現するための、あるいは、所期の形質転換の有無を確認

するための適宜塩基配列を含んでなる。以上のようなベクターとの連結には斯界で慣用の方法を適宜採用することができる。例えば、リンカーの付加やPCR法などによる制限酵素認識配列の付加、制限酵素処理、リガーゼ処理などはいずれも有用である。

#### 【0023】

上記のようなこの発明によるDNAを導入する宿主細胞としては、形質転換体の作製に斯界で慣用される、大腸菌、枯草菌、酵母、黴などの適宜の微生物や、さらには、昆虫などの無脊椎動物、植物、脊椎動物などの細胞のいずれも用いることができる。本発明に用いる蛋白質をより天然型に近い形で提供するためには、昆虫細胞を宿主とするのが比較的望ましい。前記宿主にこの発明のDNAを導入するには、例えば、リン酸-カルシウム法、エレクトロポレーション法、ウイルス感染法、さらには、必要に応じて、DEAE-デキストラン法、リポフェクション法、及びマイクロインジェクション法などを適宜適用すればよい。斯くして生成される形質転換体から目的とするのクローンを選択するには、導入されたDNAの有無や抗アレルギー蛋白質の産生能を指標として試験すればよい。なお、以上述べた組換えDNA及び形質転換体に関しては、ジェイ・サムブルック等、『モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル』、第2版（1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行）に、慣用の材料及び方法が種々詳述されている。

#### 【0024】

以上のようにして得られる形質転換体は、宿主の種類やDNAの導入の際に用いたベクターの種類に応じて、適宜の条件下で培養すれば、その細胞内又は細胞外に抗アレルギー蛋白質を産生する。培養に用いる培地には、宿主細胞やベクターの種類にもよるけれども、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の培地を使用することができる。個々の炭素源としては、例えば、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖、トレハロースなどの糖源が、又、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニア塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンステープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げ

られる。宿主細胞やベクターの種類にもよるけれども、通常、20乃至60℃、pH2乃至10に保ちつつ、で約1乃至6日間培養すれば、抗アレルギー蛋白質を含む培養物が得られる。

#### 【0025】

上記の組換えDNA技術を用いて得られる本発明で用いる蛋白質は、目的によってはそのままの形態で用いることもできるものの、通常、精製して利用する。精製方法としては、前記、天然のローヤルゼリーからの採取の場合で述べた斯界で慣用の精製方法を適宜用いることができる。

#### 【0026】

本発明に用いる配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質は、抗体又はサイトカイン産生を抑制する生物活性を有する。後記する実験例で示すように、本発明者らはOVAを抗原とし、Alumをアジュバントとして免疫したマウス脾臓細胞を抗CD3抗体で刺激した際のサイトカイン産生抑制作用を指標にして、ローヤルゼリー中の蛋白質を精製することにより、ローヤルゼリーが示す抗アレルギー活性の主体となる複数の蛋白質をRJP70及びRJP55として特定することに成功した。これらの蛋白質は、天然のローヤルゼリーの場合と同様に、免疫グロブリンE (IgE)、免疫グロブリンG (IgG) などの抗体や、インターロイキン2 (IL-2) やインターロイキン4 (IL-4)、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) などのサイトカインの産生を抑制することにより、アレルギー作用を抑制する作用を有している。

#### 【0027】

本発明に用いるRJP70とRJP55は後記する実験例で示すように、イン・ビトロ及びイン・ビボの試験において、動物細胞のIL-2、IL-4、IFN- $\gamma$ 、IgE、IgGなど、各種サイトカイン又は抗体の産生を抑制することから、これら抗体、サイトカインの産生量の増加によって引き起こされるアレルギーの発症を抑制したり、発症したアレルギー症状を緩和、治療することができる。

#### 【0028】

本発明の抗アレルギー剤は、ローヤルゼリーにおける抗アレルギー成分、例えば、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質の場合、その含量が高いほど著明な抗アレルギー作用を示す。抗アレルギー成分は高度に精製したものであっても、部分精製するか又は天然のままのものであっても良いものの、例えば、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質を有効成分とするものにおいては、顕著な抗アレルギー作用を有する抗アレルギー剤を得るためには、後記実験例で示すように、サイトカイン産生抑制試験において、蛋白質濃度  $2\text{ mg/ml}$  の抗アレルギー蛋白質を用いた場合、当該蛋白質を添加しない場合に比べて  $\text{IL-2}$  の相対産生量を  $80\%$  以下、又は、 $\text{IL-4}$  の相対産生量を  $60\%$  以下まで低下させるレベル以上にまで抗アレルギー蛋白質の含量を高めるのが望ましい。

#### 【0029】

本発明の抗アレルギー剤はアレルギー疾患のうち、とりわけアトピー性疾患に伴う諸症状を効果的に緩和する。アトピー性疾患とは皮膚炎、枯草熱、気管支喘息、蕁麻疹、アレルギー性鼻炎、昆虫アレルギー、ダニアレルギーなど、各器官において先天的家族性に現れる過敏性疾患を指し、免疫グロブリンE ( $\text{IgE}$ ) が関与するI型アレルギー反応によって発症する疾患も含まれる。

#### 【0030】

本発明の抗アレルギー剤の使用方法について説明すると、本発明の抗アレルギー剤は経口的に使用しても非経口的に使用しても、著明な抗アレルギー作用を発揮する。本発明の抗アレルギー剤の有効な摂取量又は投与量は、対象とするヒトをはじめとする哺乳動物の種類、年齢、性別などによって異なるものの、例えば、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質の場合、有効成分の質量換算で、体重  $1\text{ kg}$  あたり、通常、 $0.01\text{ mg}$  乃至  $100\text{ mg/回}$ 、望ましくは、 $0.1\text{ mg}$  乃至  $50\text{ mg/回}$ 、経口的に1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて摂取するか又は投与すればよい。摂取・投与形態としては、特に限定はなく、必要に応じて、例えば、経口経路、経管経路、経皮経路、経粘皮経路、経静脈経路などから適宜選択して使用すればよい。本発明の抗アレルギー剤を飲食物の形態に



し、これを、経口抗アトピー用剤として用いる場合には、経済性などの点から、後述する実験2の試験で高レベルのサイトカイン産生抑制活性を示す天然のローヤルゼリーを選別し、これをそのまま用いることもできる。

#### 【0031】

また、本発明の抗アレルギー剤を、例えば、化粧品などの皮膚外用剤として皮膚に直接塗布する場合、配合するローヤルゼリー由来の抗アレルギー成分の量は、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質の場合、有効成分の質量換算で、皮膚外用剤全量中、0.001乃至10質量%、好ましくは、0.01乃至1質量%であり、1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて直接皮膚に塗布すればよい。なお、0.001質量%未満では、その効果は発揮され難くなり、また、10質量%を越えると、効果が頭打ちになることから、通常、上記の範囲で加減する。

#### 【0032】

本発明の抗アレルギー剤は、例えば、飲食物、化粧品、医薬品をはじめとする組成物の形態としても有利に利用できる。斯かる組成物には、ローヤルゼリー若しくは抗アレルギー蛋白質とともに、例えば、シソ属植物及びパフィア (P f a f f i a) 属植物などの加工物などの抗アレルギー作用を持つ成分も必要に応じて配合することができ、通常、例えば、飲食物分野、化粧品分野、医薬品分野などで有利に用いることができる。更に、必要に応じて、ヒトを含む哺乳類への経口的又は経皮的適用ないしは皮膚外用が許容される成分として、飲食物、化粧品、医薬品等の分野で通常使用される、例えば、水、アルコール、澱粉質、蛋白質、アミノ酸、繊維質、糖質、脂質、脂肪酸、ビタミン、ミネラル、着香料、着色料、甘味料、調味料、香辛料、防腐剤、乳化剤、界面活性剤、賦形剤、増量剤、増粘剤、保存剤などの上記で述べた以外の成分を1種又は2種以上含有させることも有利に実施できる。これらの成分は、通常、本発明の抗アレルギー剤の各々の利用分野における必要性に応じて適宜選択される。以上のような成分を含む組成物の形態には特に制限はなく、例えば、粉末、顆粒、錠剤、ペースト、ゼリー、乳液、溶液などの所望の形態で提供される。

## 【0033】

前記糖質としては、ブドウ糖、果糖、ラクトース、トレハロース、マルトース、蔗糖、ラクトスクロース、水飴などの糖類、サイクロデキストリン、環状四糖などの環状の糖類、エリスリトール、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、マルチトール、還元水飴などの糖アルコール類、アスパルテーム、ステビア抽出物、スクラロースなどの高甘味度甘味料、プルラン、カラギーナンなどの天然多糖類、天然ガム類、合成品のカルボキシメチルセルロースなどの増粘剤などの1種又は2種以上を添加することにより、固状のものにあってはその賦形性に有利に利用できるだけでなく、本発明の抗アレルギー剤の安定化、呈味改善、風味保持などに有利に利用できる。

## 【0034】

本発明の抗アレルギー剤を配合してなる組成物を製造するには、対象とする動物類やその摂取方法又は投与方法などに応じて選ばれる適宜の組成にしたがって、本発明の抗アレルギー剤と、以上に示したような飲食物、化粧品、医薬品、医薬部外品、飼料、餌料、ペットフードの分野の何れかにおいて使用が認められている1種又は2種以上の成分とを、個々の含量に基づいて、目的に応じて混合し、希釈、濃縮、乾燥、濾過、遠心分離などの工程を適宜実施し、抗アレルギー剤を配合してなる組成物を調製し、必要に応じて所望の形状に成形すればよい。各成分を配合する順序や、当該工程を実施する時期は、抗アレルギー剤の品質劣化をきたさないかぎり、その順序や時期に制限はない。

## 【0035】

本発明の抗アレルギー剤を配合してなる組成物を飲食物の形態として用いる場合には、例えば、アイスクリーム、アイスキャンデー、シャーベットなどの氷菓、氷蜜などのシロップ、バタークリーム、カスタードクリーム、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのスプレッド及びペースト、チョコレート、ゼリー、キャンディー、グミゼリー、キャラメル、チューインガム、プリン、シュークリーム、スポンジケーキなどの洋菓子、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖菓などの加工果実ないしは加工野菜、まんじゅう、ういろう、あん、羊羹、水羊羹、カステラ、飴玉などの和菓子、醤油、粉末醤油、味噌、

粉末味噌、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、テーブルシュガー、コーヒースシュガーなどの調味料などが挙げられる。望ましい飲料の形態としては、例えば、合成酒、醸造酒、果実酒、洋酒などの酒類、ジュース、ミネラル飲料、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料、スポーツドリンク、ドリンク剤、茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、ココアなどの清涼飲料などが挙げられる。

### 【0036】

化粧品の形態として用いる場合には、例えば、ローション、クリーム、乳液、ゲル、粉末、ペースト、ブロックなどの形態で、石けん、化粧石けん、肌洗い粉、洗顔クリーム、洗顔フォーム、フェイシャルリンス、ボディーシャンプー、ボディーリンス、シャンプー、リンス、髪洗い粉などの清浄用化粧品、セットローション、ヘアブロー、チック、ヘアクリーム、ポマード、ヘアスプレー、ヘアリキッド、ヘアトニック、ヘアローション、養毛料、染毛料、頭皮用トリートメント、びん付油、つや出し油、髪油、スキ油などの頭髪化粧品、化粧水、バニシングクリーム、エモリエントクリーム、エモリエントローション、パック用化粧料（ゼリー状ピールオフタイプ、ゼリー状ふきとり型、ペースト状洗い流し型、粉末状など）、クレンジングクリーム、コールドクリーム、ハンドクリーム、ハンドローション、乳液、保湿液、アフターシェービングローション、シェービングローション、プレシェーブローション、アフターシェービングクリーム、アフターシェービングフォーム、プレシェーブクリーム、化粧用油、ベビーオイルなどの基礎化粧品、ファンデーション（液状、クリーム状、固型など）、タルカムパウダー、ベビーパウダー、ボディパウダー、パヒュームパウダー、メイクアップベース、おしろい（クリーム状、ペースト状、液状、固型、粉末など）、アイシャドウ、アイクリーム、マスカラ、眉墨、まつげ化粧料、頬紅、頬化粧水などのメイクアップ化粧品、香水、練香水、粉末香水、オーデコロン、パフュームコロン、オードトワレなどの芳香化粧品、日焼けクリーム、日焼けローション、日焼けオイル、日焼け止めクリーム、日焼け止めローション、日焼け止めオイルなどの日焼け・日焼け止め化粧品、マニキュア、ペディキュア、ネイルカラー、ネイルラッカー、エナメルリムーバー、ネイルクリーム、爪化粧料などの爪化粧品、アイライナー化粧品、口紅、リップクリーム、練紅、リップグロスなどの口唇化

粧品、練歯磨、マウスウォッシュなどの口腔化粧品、バスソルト、バスオイル、浴用化粧料などの入浴用化粧品などが挙げられる。

#### 【0037】

望ましい医薬品の形態として用いる場合には、例えば、エキス剤、エリキシル剤、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、眼軟膏剤、口腔粘膜貼付剤、懸濁剤、乳剤、硬膏剤、座剤、散剤、酒精剤、錠剤、シロップ剤、注射剤、チンキ剤、点眼剤、点耳剤、点鼻剤、トローチ剤、軟膏剤、芳香水剤、鼻用噴霧剤、リモナーゼ剤、リニメント剤、流エキス剤、ローション剤、湿布剤、噴霧剤、塗布剤、浴剤、貼付剤、パスタ剤、パップ剤などが挙げられる。以上のような形態の本発明の抗アレルギー剤を配合してなる組成物を製造するには、目的とする製品を慣用の製造方法にしたがって製造する過程の適宜の時期に本発明の抗アレルギー剤を添加すればよい。添加の時期に特に制限はないけれども、目的とする製品が加熱工程を経て製造されるものの場合には、加熱工程の後、常温、望ましくは、30℃以下に冷却した後に添加することにより、製造工程での抗アレルギー作用の減衰を防ぐことができる。以上のような本発明の組成物は、本発明の抗アレルギー成分を、製品質量あたり、通常、0.01質量%以上、望ましくは、0.1乃至100質量%含有する。

#### 【0038】

本発明の抗アレルギー剤を医薬品としてアレルギー疾患の治療、予防に用いる場合の適応症としては、例えば、前記したアトピー性疾患全般に加えて、金属アレルギー、遅延型接触皮膚炎、食物アレルギー、薬物アレルギー、化学物質過敏症などが挙げられる。また、本発明の抗アレルギー剤は、IL-2やIFN- $\gamma$ の産生を抑制することから、自己免疫疾患、例えば、多発性硬化症、多発性筋炎、慢性関節リウマチ、リウマチ熱、強皮症、多発性結節性動脈炎、活動性慢性肝炎、萎縮性胃炎、自己免疫性溶血性貧血、無精子症、バセドウ病、ベーチェット症候群、CRTS症候群、寒冷凝集素性溶血性貧血、潰瘍性大腸炎、グッドパスチャー症候群、甲状腺機能亢進症、慢性甲状腺炎、特発性アジソン病、特発性血小板減少性紫斑病、若年性糖尿病、白血球減少症、重症筋無力症、発作性寒冷血色素尿症、悪性貧血、原発性胆汁性肝硬変症、シーグレン症候群、交換性

眼炎、全身性紅斑性狼そう、ウェジナー肉芽腫症などの症状の緩和・治療にも有利に利用できる。

#### 【0039】

以上のように本発明の抗アレルギー剤は、抗アレルギー作用を示す上、該作用が安定化されているので、日常的に利用することにより、利用した生体において抗アレルギー作用が効果的に発揮され、重篤な副作用を惹起することなく、その生体の抵抗力の増強によるアレルギー疾患の予防、早期緩和、治療、及び健康な状態の維持などが達成される。したがって、本発明の抗アレルギー剤は、アレルギー疾患を予防・緩和・治療するための飲食物・化粧品・医薬品などとして極めて有用である。また、化粧品として利用する場合には、皮膚疾患の予防ならびに該疾患に対する治療効果の改善などに奏効する。

#### 【0040】

最近、ローヤルゼリーが、抗アレルギー作用を発揮することが岡秀樹ら『バイオセラピー (Biotherapy)』、第14巻、145頁乃至150頁(2000年)や、片岡麻里ら『ナチュラル・メディシNZ (Natural Medicines)』、第55巻、174頁乃至180頁(2001年)によって報告されている。しかしながら、ローヤルゼリーが有する抗アレルギー作用の主体となる物質がローヤルゼリーに含まれる蛋白質、糖質、脂質、又はそれ以外の物質のいずれであるのかは全く分かっておらず、後記する実験2の試験方法によりサイトカイン産生抑制活性が高レベルで認められたローヤルゼリーを経口投与すると、後記する実験7で示したように著明な抗アトピー作用を発揮することや、配列表における配列番号1又は2のいずれかで示される部分アミノ酸配列を有する蛋白質が抗アレルギー作用を有することを明らかに示したのは本発明をもって嚆矢とする。

#### 【0041】

以下に、本発明に用いるローヤルゼリー及び抗アレルギー蛋白質について、具体的な実験例をあげて本発明をさらに詳しく説明する。

#### 【0042】

##### 【実験1】

### <ローヤルゼリー水溶性蛋白質画質分の調製>

凍結保存していた生ローヤルゼリー（ブラジル産）25 gを室温にて融解し、20 mM トリスー塩酸緩衝液（pH 8.0）に懸濁した後、同緩衝液 5 L に対して透析した。次いで、得られた透析液を遠心分離（12,000 rpm、15分）することにより不溶物を除去して回収した上清液を0.22  $\mu$ mのフィルターでろ過して50 mgローヤルゼリー相当/mlのローヤルゼリー水溶性蛋白質画分を得た。

### 【0043】

#### 【実験2】

### <マウス脾臓細胞を用いたサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性の測定>

OVAを抗原とし、Alumをアジュバントとして3回免疫したBALB/cマウスより回収した脾臓細胞を $5 \times 10^6$  個/mlに調製し、抗CD3抗体（5  $\mu$ g/ml）で固相化した96ウェルのマイクロプレートに、100  $\mu$ lずつ播きこんだ。次いで、実験1で用いた生ローヤルゼリーを2.0 mg/ml又は4.0 mg/mlの各蛋白濃度に、又は、実験1で得たローヤルゼリー水溶性蛋白質画分を2.0 mg/ml又は4.0 mg/mlの各蛋白濃度に調製し、これを50  $\mu$ lずつ添加した。更に、各ウェルに培地を50  $\mu$ l添加し、総液量200  $\mu$ lとした。40時間培養した後培養上清液を回収し、IL-4、IL-2の各サイトカイン量を常法の、固相酵素免疫測定法（ELISA法）にて測定した。ローヤルゼリー水溶性蛋白質画分の代わりにリン酸緩衝生理食塩水（以下、本明細書では単にPBS（-）と略称する。）を用いて同様に行ったものを対照とした。対照のサイトカイン産生量を100%として生ローヤルゼリー及びローヤルゼリー水溶性蛋白質画分の相対的なサイトカイン産生量をパーセントで表した。結果を表2に示した。

### 【0044】

【表 2】

試 料	蛋白濃度 (mg/ml)	相対サイトカイン産生率(%)	
		IL-2	IL-4
対照1 PBS(-)	-	100	100
生ローヤルゼリー	2.0	103	73
	4.0	72	34
RJ水溶性蛋白質画分	2.0	76	54
	4.0	43	16

RJ:ローヤルゼリー, IL-2:インターロイキン2, IL-4:インターロイキン4

## 【0045】

表2の結果から明らかなように、試験した生ローヤルゼリー及びローヤルゼリー水溶性蛋白質画分は用量依存的にIL-4、IL-2の産生を抑制した。生ローヤルゼリーの場合、蛋白濃度2.0mg/mlのときのIL-2相対産生率及びIL-4相対産生率はそれぞれ103%、73%であった。ローヤルゼリー水溶性蛋白質画分の場合、蛋白濃度2.0mg/mlのときのIL-2相対産生率及びIL-4相対産生率はそれぞれ76%、54%であった。これらの結果から、透析、遠心分離などの精製操作を加え、糖質などの水溶性非蛋白質画分及び不溶性物質を除くことにより、生ローヤルゼリーに比べて蛋白質当りのサイトカイン産生抑制活性（抗アレルギー活性）を高めた標品が得られることが判明した。

## 【0046】

## 【実験3】

<ローヤルゼリーからの抗アレルギー活性蛋白質の精製及びその理化学的性質>

## 【実験3-1】

<ローヤルゼリーからの抗アレルギー活性蛋白質の精製>

実験2で認められたOVA/Alumで免疫したマウス脾臓細胞のサイトカイン産生抑制活性を指標としてローヤルゼリーから抗アレルギー活性蛋白質を精製した。また、同時に細胞増殖能を、酸化-還元インディケーターである色素（トレック・ダイアグノスティック社製、商品名『アラマー・ブルー（alar Blue）』）を用いて544nmを励起波長とし、590nmを測定波長として蛍光強度を測定した。実験1で得たローヤルゼリー水溶性画分を、『DEA

E-5PW』ゲル（株式会社東ソー製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（ゲル量54ml）に供したところ、サイトカイン産生抑制活性及び細胞増殖抑制活性を有する蛋白質はDEAE-E5PWゲルに吸着した。蛋白質の溶出を280nmの吸光度を測定することにより追跡しながら、吸着した蛋白質を食塩濃度0Mから0.3Mに上昇するリニアグラジエントで溶出させ、図1に示すように食塩濃度約0.08M付近で溶出する活性蛋白質（図1における太線1）と、0.17乃至0.25M付近に溶出する活性蛋白質（図1における太線2）の2種の蛋白質を分離、回収した。前者を活性蛋白質1と、また、後者を活性蛋白質2とし、別々に精製することにした。

【0047】

### 【実験3-2】

#### <活性蛋白質1の精製>

実験3-1で得た活性蛋白質1を含有するフラクションを食塩濃度0.01Mの20mMトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）に対して透析し、透析液を『リソース（Resource）Q』ゲル（アマシャム・バイオサイエンス社製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー（ゲル量6ml）に供した。活性蛋白質1はリソースQゲルに吸着し、食塩濃度0Mから0.5Mに上昇するリニアグラジエントで溶出させたところ、食塩濃度約0.1M付近で溶出した。活性画分を回収し、食塩濃度0.05Mの同緩衝液対して透析し、透析液を『ヘパリン（Heparin）-5PW』ゲル（株式会社東ソー製）を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィー（ゲル量3.3ml）に供した。その結果を図2に示す。活性蛋白質1はヘパリン-5PWゲルに吸着し、食塩濃度0Mから1Mに上昇するリニアグラジエントで溶出させ、実験2及び実験3-1の方法でサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性を有する画分を調べたところ、食塩濃度約0.15M付近で溶出する活性蛋白質1-1（図2における太線1）と、約0.35M付近に溶出する活性蛋白質1-2（図2における太線2）の2種が検出された。両者は後述するように同一のN末端アミノ酸配列を有しており、活性蛋白質1-2の方が分子量が大きく比活性も高いことから、活性蛋白質1-2を更に精製した。活性蛋白質1-2を含有するフラクションを『スーパーデックス（S



uperdex) 200』ゲル (アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (ゲル量 320 ml) に供し、1.5 倍濃度の PBS (リン酸緩衝液) を用いて溶出した。この活性画分を回収し、OVA/Alum で免疫したマウス脾臓細胞のサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性を有する精製活性蛋白質 1-2 を得た。活性蛋白質 1 の各精製ステップに於ける蛋白量、比活性を表 3 に示す。(但し、表 3 中、ヘパリン-5PW 回収区以降は活性蛋白質 1-2 の数値を表す。)

【0048】

【表 3】

精製ステップ	液量 (ml)	全蛋白 (mg)	相対 IL-4 産生 (%)*
ローヤルゼリー水溶性画分	475	1057	9
DEAE-5PW 回収区	325	114	23
Resource Q 回収区	40	80	<2
Heparin-5PW 回収区	95	38	24
Superdex 200 回収区	20	30	6

\* 各精製ステップにおける回収区の前液を用いた際の値

【0049】

得られた精製活性蛋白質 1-2 を還元剤ジチオスレイトール (DTT) 存在下でゲル濃度 10% (w/v) の SDS-PAGE に供し、精製標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で、純度の高い標品であった。

【0050】

## 【実験 3-3】

<活性蛋白質 1 の理化学的性質>

## (1) 分子量

実験 3-2 で得た OVA/Alum で免疫したマウス脾臓細胞のサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性を有する精製活性蛋白質 1-2 と、同じく実験 3-2 で得た部分精製活性蛋白質 1-1 を実験 3-2 と同様に還元剤 DTT 存在下での SDS-PAGE に供し、同時に泳動した分子量マーカー (アマシャム・バイオサイエンス社製、商品名『LMW エレクトロフォレシス・キャリブレーション・キット (LMW Electrophoresis Calibration Kit)』) を用いて分子量を測定した。その結果、精製活性蛋白質 1-2 の分子量は約 100 kDa と推定された。

on Kit)』)と比較して当該活性蛋白の分子量を測定したところ、活性蛋白 1-2 は分子量約 70 kDa に相当する位置に、また、活性蛋白 1-1 は分子量約 55 kDa に相当する位置に、それぞれ蛋白バンドが検出された。

## (2) N末端アミノ酸配列

実験 3-2 で得た活性蛋白 1-2 精製標品及び活性蛋白 1-1 部分精製標品の N末端アミノ酸配列 10 残基を、常法により、プロテインシーケンサー (アプライド・バイオシステムズ社製、モデル 473A) を用いて分析したところ、両者とも同一の、配列表における配列番号 1 の N末端アミノ酸配列を有していた。両者の内、約 70 kDa の分子量を有する活性蛋白 1-2 を本発明者は RJP70 と命名した。

【0051】

## 【実験 3-4】

### <活性蛋白 2 の精製>

実験 3-1 で得た活性蛋白 2 を含有するフラクションを食塩濃度 0.01M の 20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して透析し、透析液を『リソース (Resource) Q』ゲル (アマシャム・バイオサイエンス社製) を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (ゲル量 6ml) に供した。活性蛋白 2 はリソース Q ゲルに吸着し、食塩濃度 0.1M から 0.4M に上昇するステップグラジエントで溶出させた。活性画分を回収し、活性蛋白 2 を含有するフラクションを『スーパーデックス (Superdex) 200』ゲル (アマシャム・ファルマシア・バイオテク製) を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィー (ゲル量 320ml) に供し、1.5 倍濃度の PBS (-) を用いて溶出した。活性画分は 2 つ認められたものの、両者は還元剤存在下での SDS-PAGE において同一の約 55 kDa の分子量を示し、同一の蛋白が単量体と多量体として分離したと考えられた。この活性画分を両方まとめて回収し、OVA/Alum で免疫したマウス脾臓細胞のサイトカイン産生抑制及び細胞増殖抑制活性を有する精製活性蛋白 2 を得た。活性蛋白 2 の各精製ステップに於ける蛋白量、比活性を表 4 に示す。

【0052】

【表 4】

精製ステップ	液量 (ml)	全蛋白 (mg)	相対 IL-4 産生 (%)*
DEAE-5PW 回収区	88	40.7	61.2
Resource Q 回収区	2.8	36.3	22.8
Superdex 200 回収区	8.5	23	18.9

\* 各精製ステップにおける回収区の原液を用いた際の値

## 【0053】

精製活性蛋白質 2 を還元剤 D T T 存在下でゲル濃度 10% (w/v) の S D S - P A G E に供し、精製標品の純度を検定したところ、蛋白バンドは単一で、純度の高い標品であった。

## 【0054】

## 【実験 3-5】

< 活性蛋白質 2 の理化学的性質 >

## (1) 分子量

実験 3-4 で得た精製活性蛋白質 2 を実験 3-3 と同様に還元剤 D T T 存在下での S D S - P A G E に供したところ、分子量約 55 k D a に相当する位置に蛋白質バンドが検出された。

## (2) N 末端アミノ酸配列

実験 3-4 で得た精製活性蛋白質 2 の N 末端アミノ酸配列を、常法により、プロテインシーケンサー (アプライド・バイオシステムズ社製、モデル 473A) を用いて 25 残基分析したところ、配列表における配列番号 2 の N 末端アミノ酸配列を有していた。活性蛋白質 2 を本発明者は R J P 55 と命名した。

## 【0055】

## 【実験 4】

< R J P 70 精製標品のサイトカイン産生抑制作用 >

実験 3-2 で得た R J P 70 精製標品を用いて、11.7、23.4、46.9、93.8、188、及び 375  $\mu$ g/ml の 6 段階の濃度の溶液を調製し、実験 2 と同様に、R J P 70 精製標品のマウス脾臓細胞を用いたサイトカイン産生抑制作用を調べた。また、実験 3-1 と同様の方法で細胞増殖能を調べた。結

果を表5に示した。

【0056】

【表5】

試料	サイトカイン産生及び細胞増殖率(%)		
	IL-2	IL-4	細胞増殖
対照 (PBS(-))	100	100	100
RJP70精製標品 11.7 $\mu$ g/ml	78	93	96
23.4 $\mu$ g/ml	84	105	100
46.9 $\mu$ g/ml	62	57	83
93.8 $\mu$ g/ml	70	41	68
188 $\mu$ g/ml	63	33	68
375 $\mu$ g/ml	42	8	49

IL-2: インターロイキン2, IL-4: インターロイキン4

【0057】

表5から明らかなように、RJP70精製標品は用量依存的にIL-2及びIL-4の産生を抑制し、且つ、細胞の増殖を抑制した。

【0058】

【実験5】

<RJP70精製標品のT細胞に対する作用と細胞障害性>

RJP70のT細胞に対する直接的な作用と細胞障害性を調べるためにマウス脾臓細胞から精製したCD4<sup>+</sup>T細胞を抗CD3抗体で刺激する試験系で活性を確認した。

【0059】

【実験5-1】

<マウス脾臓細胞からのCD4<sup>+</sup>T細胞の調製>

実験2の方法で調製したBALB/cマウス脾臓細胞を10 (v/v) %ウシ胎仔血清 (FCS) を含むRPMI 1640培地に懸濁し、FCSでコートしたシャーレで37℃、1時間保持し、接着性の細胞を除去した。続いて、ヤギ抗マウスIgでコートしたシャーレを同様に用いて、B細胞を除去した。更に、抗マウスCD4抗血清でコートしたシャーレに接着する細胞を回収することにより、CD4<sup>+</sup>T細胞を得た (CD4<sup>+</sup>T細胞含量91乃至93%)。

## 【0060】

## 【実験5-2】

<RJP70精製標品のCD4<sup>+</sup>T細胞からのサイトカイン産生抑制作用と細胞障害性>

実験3-2の方法で得たRJP70精製標品と、実験5-1で得たCD4<sup>+</sup>T細胞を用い、実験2と同様にしてサイトカイン産生抑制作用を調べた。RJP70精製標品の31.3、62.5、125、250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4段階の濃度の溶液を調製し、IL-2、IL-4及びIFN- $\gamma$ の産生抑制作用を調べた。RJP70精製標品に代えてPBS(-)を用いた以外は同様に処理したものを対照とし、対照のサイトカイン産生量を100としたときの相対値を算出した。また、トリパンブルー色素排除法により、用いたCD4<sup>+</sup>T細胞の生細胞と死細胞の数を調べ、次式で生存細胞比率(%)を求め、細胞障害性の指標とした。結果を表6に示した。

## 【0061】

## 【数1】

$$\text{生存細胞比率}(\%) = \{\text{生細胞数} / (\text{生細胞数} + \text{死細胞数})\} \times 100$$

## 【0062】

## 【表6】

試料	サイトカイン産生率(%)			生存細胞比率 (%)
	IL-2	IL-4	IFN- $\gamma$	
対照(PBS(-))	100	100	100	84.1 $\pm$ 2.4
RJP70精製標品 31.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$	78	97	96	83.8 $\pm$ 2.5
62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	59	84	91	82.7 $\pm$ 1.9
125 $\mu\text{g}/\text{ml}$	24	68	68	84.6 $\pm$ 0.1
250 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3	13	27	85.0 $\pm$ 1.5

IL-2: インターロイキン2, IL-4: インターロイキン4, IFN- $\gamma$ : インターフェロン $\gamma$

## 【0063】

表6から明らかなように、RJP70はCD4<sup>+</sup>T細胞を用いた系でもマウス脾臓細胞の系(実験4)とほぼ同様な傾向でIL-2、IL-4の産生を抑制し、また、IFN- $\gamma$ の産生も抑制した。このとき、生存細胞の比率は対照と同等であり、RJP70に細胞障害性は認められなかった。

## 【0064】

## 【実験6】

＜ローヤルゼリー及びRJP70精製標品の抗体産生抑制作用＞

ローヤルゼリー又はRJP70の投与が、OVA/Alumで免疫したマウスの抗体産生に及ぼす影響を調べた。雌性BALB/cマウス（7週齢、日本チャールスリバー株式会社）各5匹に対し、一週間おきに3回、OVA 2  $\mu$ g/Alum 3 mgを腹腔内投与にて免疫した。ローヤルゼリーは実験1で用いたものを使用し、PBS（－）に溶解したものをマウス1匹当たり1回に50  $\mu$ gとなるように、また、RJP70は実験3-2の方法で得たものを使用し、同じくPBS（－）に溶解した精製標品をマウス1匹当たり1回に0.5、5、50  $\mu$ gとなるようにして、3回行われた各免疫操作（OVA/Alum投与）の2日前、6時間前の2回にわたり、計6回、腹腔内投与した。また、対照としてPBS（－）を用いて同様に行った。試験群を表7にまとめた。

## 【0065】

【表7】

群	投与試料	投与量・回数	匹数	免疫(IgE誘導)方法
1	PBS(-)(対照1)	—	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内
2	ローヤルゼリー	50 $\mu$ g/匹・6回	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内
3	RJP70	0.5 $\mu$ g/匹・6回	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内
4	RJP70	5 $\mu$ g/匹・6回	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内
5	RJP70	50 $\mu$ g/匹・6回	5	OVA/Alum, 3回, 腹腔内

OVA: 卵白アルブミン(抗原)

Alum: 水酸化アルミニウムゲル(アジュバント)

## 【0066】

3回目の免疫から一週間後に採血し、血清中の各種抗体濃度を酵素免疫測定法(EIA法)により測定した。抗OVA-IgE抗体価はキャプチャードEIA法により測定し、標準血清(640 U/ml)を用いて作成した検量線より算出した。また、抗OVA-IgG1抗体価は間接EIA法により測定し、標準血清(128,000 U/ml)を用いて作成した検量線より算出した。各測定値の統計処理は対照群と試験群の間で分散性を検討し、T検定或いはウェルヒ(We

l c h) 法により有意差検定を行った。1 群 5 匹での各測定値の中に他とかけ離れた値がある場合にはスミルノフ (S m i r n o v) の棄却検定に従った。測定した結果を、抗 O V A - I g E 抗体価について図 3 に、また、抗 O V A - I g G 1 抗体価について図 4 に示した。

#### 【0067】

図 3 から明らかなように、ローヤルゼリーと R J P 7 0 のいずれにも抗 O V A - I g E 抗体価を低下させる作用が認められた。ローヤルゼリー投与群の抗 O V A - I g E 抗体価は対照 (P B S (-) 投与群) と比較して、61%の有意な抑制が認められた。また、R J P 7 0 精製標品投与群では投与量に依存して抗 O V A - I g E 抗体価が低くなり、その抑制率は 0.5  $\mu$ g/匹投与群で 13%、5  $\mu$ g/匹投与群で 39%、50  $\mu$ g/匹投与群で 67%であった。また、図 4 から明らかなように、抗 O V A - I g G 1 抗体価も I g E の場合とほぼ同様に、ローヤルゼリー投与群及び R J P 7 0 精製標品のすべての投与群で 46~82%の有意な抑制が認められた。

#### 【0068】

以上の結果より、本発明に用いるローヤルゼリー及び R J P 7 0 には I g E、I g G 1 抗体の産生を抑制する作用があり、アレルギー反応を抑制することが確認された。

#### 【0069】

##### 【実験 7】

##### <アトピー性皮膚炎の発症抑制作用>

N c / N g a マウス (雌、5 週齢、日本チャールスリバー社販売) に対して、ピクリルクロライドを塗布することによりアトピー性皮膚炎と酷似する皮膚炎を誘発させて作成したアトピー性皮膚炎モデルマウスを用いて、実験 1 で用いた生ローヤルゼリー及び実験 3-2 の方法で得た R J P 7 0 のアトピー性皮膚炎の発症抑制作用を調べた。まず、バリカンで剃毛したマウスの腹部及び胸部にエタノール：アセトン (容量比 4 : 1) の混合液に 5% (w/v) の濃度に溶解したピクリルクロライド溶液を塗布して初回感作を行った。初回感作より 4 日めにオリーブ油に 1% (w/v) の濃度に溶解したピクリルクロライド溶液を麻酔したマ

ウス背部及び耳介に塗布した。その後、1週おきにさらに計5回、同溶液を背部及び耳介に塗布した。実験1で用いた生ローヤルゼリー(1.0mg/マウス)又は実験3-2の方法で得たRJP70精製標品(0.3mg/マウス)を、胃ゾンデを用いて初期感作の3日前より1日に1回、週5回、6週間、10匹のマウスに経口投与した。対照としてPBS(-)を同様に10匹のマウスに経口投与した。ピクリルクロライドによる初回感作から3週めより週に2回、皮膚症状(掻痒症、発赤・出血、浮腫、擦傷・組織欠損、痂皮形成・乾燥)を肉眼にて判定し、評価した。

#### 【0070】

生ローヤルゼリー投与群及びRJP70投与群は対照群と比べて有意に症状が軽く、アトピー性皮膚炎の発症を抑制していた。この結果は本発明に用いるローヤルゼリー及び抗アレルギー蛋白質RJP70が、アトピー性のアレルギー症状を緩和する作用を有する物質であることを示している。

#### 【0071】

##### 【実験8】

##### <急性毒性試験>

5質量%アラビアガムを含む生理食塩水にRJP70又はRJP55の適量をそれぞれ溶解した後、常法に従いろ過除菌した。これらを体重20乃至25gのddYマウス(10匹/群)の腹腔内に注射投与するか、胃ゾンデにより経口投与した後、7日間に亘って経過を観察した。その結果、いずれの試料、いずれの投与経路によっても、試みた最大投与量である10mg/kg体重においても死亡例が認められなかった。この結果は本発明に用いる抗アレルギー蛋白質RJP70及びRJP55が、ヒトを含む哺乳類に常用しても安全な物質であることを示している。

#### 【0072】

##### 【実験9】

##### <RJP70及びRJP55をコードするDNA(cDNA)のクローニング>

#### 【0073】

##### 【実験9-1】



### <ミツバチからの全RNAの調製>

全RNAの調製は、通常のグアニジンチオシアネート／酸性フェノール：クロロホルム法を採用したRNA調製キット（アンビオン社製、商品名『トータルRNAキット（TOTALLY RNA kit）』）を用い、キットに添付された説明書に従って行った。まず、セイヨウミツバチ（*Apis mellifera* L.）の成虫 12匹の頭部を変性溶液に浸し、ホモジナイザーで破碎して抽出液 10 ml を得た。等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（容量混合比 25：24：1）溶液を加えて混和し、遠心分離して得た上層部分に、0.1 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム（pH 4.5）、抽出液と等量の酸性フェノール：クロロホルム溶液の順に添加・攪拌し、遠心分離して上層部分を回収した。これに、イソプロパノール液を加えて -20℃ で 1 時間保持し、遠心して得られた沈殿物を、70% (v/v) エタノール水溶液で洗浄・乾燥後、300  $\mu$ l の 0.1 mM エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液で溶解した。70℃ で 10 分間熱処理後、150  $\mu$ l の 7.5 M 塩化リチウムと 50 mM EDTA を含む溶液を添加し、-20℃ で 1 時間保持した。遠心後の沈殿物は、70% (v/v) エタノール水溶液で洗浄・乾燥後、0.5 mM EDTA を含むジエチルピロカーボネート（DEPC）処理水に溶解し、186  $\mu$ g の全RNAを調製した。

【0074】

### 【実験9-2】

### <RJ P70をコードするcDNAのクローニング>

実験9-1で得た全RNA（1  $\mu$ g/ $\mu$ l）を 5  $\mu$ l、0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l のランダムヘキサマーを 5  $\mu$ l、及びDEPC処理水 50  $\mu$ l を 0.5 ml 容チューブに入れ、サーマルサイクラー（パーキンエルマー社製、商品名『DNAサーマルサイクラー 480』）を用いて、70℃ で 5 分間加熱後、4℃ に急冷させた。これに、5 倍濃度 RT-PCR 反応液を 20  $\mu$ l、100 mM ジチオトレイトールを 10  $\mu$ l、25 mM dNTP を 5  $\mu$ l、200 U/ $\mu$ l のモロニーマウス白血病ウイルス（M-MLV）逆転写酵素（インビトロジェン社製）を 5  $\mu$ l 加え、25℃ で 10 分間、42℃ で 30 分間、99℃ で 5 分間保持して逆転写反

応を行い、第1ストランド cDNA を含む水溶液を得た。次いで、ジェンバンクデータベースより入手したMRJP3のcDNA塩基配列の情報に基づき合成した、配列表における配列番号9の塩基配列を有するセンスプライマーと、配列表における配列番号10の塩基配列を有するアンチセンスプライマーを用いて常法に従い、PCRによる増幅を行った。逆転写反応産物  $2\mu\text{l}$  に、宝酒造社製の10倍濃度 Ex Taq 反応液を  $5\mu\text{l}$ 、Ex Taq ポリメラーゼ ( $2.5\text{U}/\mu\text{l}$ ) を  $1\mu\text{l}$ 、 $2.5\text{mM}$  dNTP を  $4\mu\text{l}$ 、上記センスプライマー ( $100\text{ng}/\mu\text{l}$ ) を  $1\mu\text{l}$ 、上記アンチセンスプライマー ( $100\text{ng}/\mu\text{l}$ ) を  $1\mu\text{l}$  加え、滅菌水で  $50\mu\text{l}$  とした。反応は、 $94^{\circ}\text{C}$  で30秒間、 $61^{\circ}\text{C}$  で30秒間、 $72^{\circ}\text{C}$  で3分間の順で35サイクル行った。PCR産物を0.9%アガロースゲル電気泳動に供したところ、約1,600 bp 付近に増幅されたDNA断片のバンドが検出された。常法により、この増幅DNA断片をゲルから抽出し、回収した。この一部を、クローニングキット (ストラタジーン社製、『pCR-Script SK (+) Cloning Kit』) を用い、添付の説明書に従って操作して、プラスミドベクター『pCR-Script Cam SK (+)』との連結反応に供した。連結反応産物の一部で、大腸菌コンピテントセル (ストラタジーン社製、『XL10-Gold Kan』) を、添付の説明書に従って操作し、形質転換した。形質転換した大腸菌は、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$  クロラムフェニコールを含んだLB ( $1\%$  塩化ナトリウム、 $1\%$  トリプトン、 $0.5\%$  酵母エキス) -  $2\%$  寒天平板培地に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  にて16時間培養した。出現したコロニーを、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$  クロラムフェニコールを含むLB液体培地に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  で16時間振とう培養し、常法により、菌体より組換えDNAを調製した。通常のアオキシ法により、DNAシーケンサー (アプライドバイオシステムズ社製、モデル373A) を用いて塩基配列解析を行ったところ、RJP70 cDNA は配列表における配列番号5の塩基配列を有していた。なお、配列表における配列番号3のアミノ酸配列は、配列表における配列番号5の塩基配列に並記したアミノ酸配列から分泌シグナル配列に相当する20アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を除いた、成熟型蛋白質のアミノ酸配列である。

【0075】

## 【実験 9-3】

## &lt; R J P 55 をコードする c D N A のクローニング &gt;

ジェンバンクデータベースより入手した M R J P 1 の c D N A 塩基配列の情報に基づき合成した、配列表における配列番号 11 の塩基配列を有するセンスプライマーと、配列表における配列番号 12 の塩基配列を有するアンチセンスプライマーを用い、P C R 反応を 94℃で30秒間、46℃で30秒間、72℃で3分間の順で5サイクル、引き続き、94℃で30秒間、61℃で30秒間、72℃で3分間の順で35サイクル行った以外は、実験 9-2 と同様にして R J P 55 c D N A をクローニングし、塩基配列解析を行った。クローニングした R J P 55 c D N A は配列表における配列番号 6 の塩基配列を有していた。なお、配列表における配列番号 4 のアミノ酸配列は、配列表における配列番号 6 の塩基配列に並記したアミノ酸配列から開始コドン A T G がコードするメチオニンを1残基除いた、成熟型蛋白質のアミノ酸配列である。

【0076】

## 【実験 10】

## &lt; 組換え D N A 技術による抗アレルギー蛋白質の生産 &gt;

【0077】

## 【実験 10-1】

## &lt; R J P 70 組換えバキュロウィルスの調製 &gt;

実験 9-2 で得た R J P 70 の完全長 c D N A について、B D ファーミンジェン社製の『B D バキュロゴールド・トランスフェクション・キット (B D B a c u l o G o l d T r a n s f e c t i o n K i t) 』を用い、昆虫細胞での蛋白発現用組換えバキュロウィルスを調製した。実験 9-2 で得られた組換え D N A は、制限酵素 N o t I 及び B a m H I にて消化後、0.9% (w/v) アガロース電気泳動を行い、1600bp 付近の R J P 70 c D N A 断片をゲルより抽出・精製した。これを、宝酒造社製の『ライゲーション・キット バージョン 2 』を用いて、バキュロウィルス・トランスファーベクター『p V L 1393 』のポリヘドリン・プロモーター下流の B a m H I - N o t I 部位に連結させた。連結反応産物の一部で、宝酒造社製の大腸菌コンピテントセル『J M 109 』

株を、添付の説明書に従って操作し、形質転換した。形質転換した大腸菌は、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリンを含んだLB-2%寒天平板培地に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ にて16時間培養した。出現したコロニーを、 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン含有LB液体培地に接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ で16時間振とう培養後、常法により、菌体から組換えDNAを調製し、RJP70cDNAの挿入を確認後、RJP70組換えベクター『pVL1393-rjp70-4』を作製した。次に、キットの添付説明書の操作方法に従い、Sf9昆虫細胞(ATCC CRL-1711、ヨトウガ由来)を用いて、組換えウィルスの作製を行った。Sf9は、10%(v/v) FCS添加のTC100培地(インビトロジェン社製)を用い、6穴プレートに $1\times 10^6$ 個/ウェルで播種し、10分間付着させ、上清除去後、0.5mlのトランスフェクション・バッファーA液(10%(v/v) FCS含有グレース培地)に置換した。これに、あらかじめ $1.5\mu\text{g}$ の『pVL1393-rjp70-4』と $0.25\mu\text{g}$ の『BDバキュロゴールド・バキュロウィルスDNA』を混合して5分間反応させた後に、0.5mlのトランスフェクション・バッファーB液(125 mM塩化カルシウム、140 mM塩化ナトリウム、25 mM HEPES, pH 7.1)を添加した混合液を、0.5ml/ウェルで添加し、 $27^{\circ}\text{C}$ で4時間感染させた。対照として、野性型バキュロウィルスを含むバッファーB液を同様の方法で0.5ml/ウェルで別途Sf9昆虫細胞に添加し、感染させた。次に、各ウェルを10%(v/v) FCS添加TC-100培地で1回洗浄後、同培地2mlを添加し、更に $27^{\circ}\text{C}$ で6日間培養を行った。各培養液を1,000 rpmで5分間遠心分離して上清を回収し、RJP70組換えバキュロウィルス調製液あるいはウィルスコントロール液とした。更にそれぞれのウィルスの力価を上げるため、Sf9細胞 $1\times 10^7$ 個に上記の調製液を50乃至200 $\mu\text{l}$ 添加し、 $27^{\circ}\text{C}$ で1週間感染させ、遠心分離して得た上清を、蛋白発現用のRJP70組換えウィルス液及びウィルスコントロール(野生型ウィルス)液として調製した。

【0078】

【実験10-2】

<RJP70組換え蛋白の調製>

蛋白発現用細胞として、昆虫細胞株（インビトロジェン社製、イラクサギンウワバ由来、『High Five』）を用いた。昆虫細胞株は、L-グルタミン（最終濃度 1mg/ml）を添加したエクスプレスファイブ無血清培地（インビトロジェン社製）を用いて  $1 \times 10^8$  個/10ml に調製し、実験 10-1 で得た RJP70 組換えウイルス液を 200  $\mu$ l 添加し、10 分毎に攪拌しながら 1 時間感染させた。次に、エクスプレスファイブ無血清培地を 40ml 添加後、27℃で 1 週間培養を行った。培養上清は、15,000rpm で 30 分間遠心分離してウイルスを除去し、分画分子量 30 キロダルトンの限外ろ過膜（ミリポア社製、商品名『ウルトラフリー 15 UFV2BTK10 <30000』）で遠心濃縮し、続いて『セファデックス（Sephadex）G-25M』ゲル充填カラム（アマシャムバイオサイエンス社製、商品名『PD-10』）を用いて 1.5 倍濃度の PBS（-）に交換し、アッセイに使用可能な組換え RJP70 液を調製した（回収した培養上清の 20 倍濃縮液）。また、RJP70 組換えウイルスの代わりにウイルスコントロール液を用いた以外は上記と同様に操作して、対照として用いる試料液を調製した。

#### 【0079】

#### 【実験 10-3】

#### <組換え RJP70 のサイトカイン産生抑制活性>

実験 2 で示した活性測定方法により、組換え RJP70 の IL-2 及び IL-4 産生抑制作用を調べた。実験 10-2 で得た組換え RJP70 液及び対照に、それぞれ 0.5 倍量の滅菌水を加えたものを原液として活性測定を行い、対照のサイトカイン産生量を 100% とした時の相対値を算出して、RJP70 の活性を評価した。結果を表 8 に示した。

#### 【0080】

【表 8】

試 料	相対サイトカイン産生率(%)	
	IL-2	IL-4
対照 (ウイルスコントロール)	100	100
組換えRJP70 20 $\mu$ g/ml*	101	86
102 $\mu$ g/ml*	60	79
307 $\mu$ g/ml*	57	66
920 $\mu$ g/ml*	43	49

\* 数値はウイルス感染細胞の培養上清に含まれる総蛋白濃度を示す。

## 【0081】

表 8 から明らかなように、組換え R J P 7 0 液は、用量依存的に I L - 2 及び I L - 4 の産生を抑制した。このことは R J P 7 0 蛋白質が抗アレルギー作用を有することを示している。

## 【0082】

以下に、具体的な実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

## 【0083】

## 【実施例 1】

## ＜抗アレルギー剤＞

市販の  $\alpha$  ,  $\alpha$  -トレハロースの含水結晶（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』）8.5質量部と、実験3-2の方法で精製し、実験3-2で物理化学的性質を明らかにしている R J P 7 0 精製標品の凍結真空乾燥品1.5質量部とを均一に混合し、粉碎機を用いて粉末にした。この粉末を0.42mm  $\phi$  メッシュの篩を通過したものを回収し、本発明の抗アレルギー剤を得た。実験2に準じて試験し、当該抗アレルギー剤がサイトカインの産生を抑制することを確認した後、常温で10日間保存して再度実験2に準じて試験し、安定してサイトカインの産生を抑制する抗アレルギー作用を示すことを確認した。

## 【0084】

当該抗アレルギー剤を打錠機を用いて1錠あたり約200mgの錠剤に成形した。本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できる

かつ著効を示す抗アレルギー剤である。本品は、まろやかな甘味を示すので、日常的に利用する健康食品としても有用である。

#### 【0085】

##### 【実施例 2】

##### ＜抗アレルギー剤＞

以下の成分を以下の配合で均一に混合した後、実施例 1 に準じて操作して、粉末形態の本発明の抗アレルギー剤を調製した。なお、RJP70 及び RJP55 に関しては実験 3-2 及び 3-4 の方法で精製し、実験 3-3 及び 3-5 で物理化学的性質を明らかにしている精製標品を凍結真空乾燥して得た蛋白質としての質量部で混合した。調製後、実験 2 に準じて試験し、当該抗アレルギー剤が常温保存後も安定してサイトカインの産生を抑制し、抗アレルギー作用を示すことを確認した。

$\alpha$ ,  $\alpha$ -トレハロース (株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』)

7.7 質量部

RJP70 精製標品の凍結乾燥粉末

1.0 質量部

RJP55 精製標品の凍結乾燥粉末

0.4 質量部

糖転移ヘスペリジン (株式会社林原商事販売、商品名『 $\alpha$ GヘスペリジンPS』)

0.4 質量部

プルラン (株式会社林原商事販売、商品名『プルランPF-20』)

0.5 質量部

#### 【0086】

この抗アレルギー剤を、打錠機を用いて 1 錠あたり約 300mg の錠剤に成形した。本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示す抗アレルギー剤である。本品は、まろやかな甘味を示すので、日常的に利用する健康食品としても有用である。

#### 【0087】

##### 【実施例 3】

### <抗アレルギー剤>

以下の成分を以下の配合で均一に混合した後、実施例 1 に準じて操作して、粉末の形態の本発明の抗アレルギー剤を調製した。なお、部分精製ローヤルゼリーとしては、実験 3-1 の方法で『DEAE-5PW』ゲル（株式会社東ソー製）を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにて部分精製した活性蛋白質 1 画分を凍結真空乾燥して得た蛋白質としての質量部で混合した。調製後、実験 2 に準じて試験し、当該抗アレルギー剤が常温保存後も安定してサイトカインの産生を抑制し、抗アレルギー作用を示すことを確認した。

無水結晶マルトース（株式会社林原商事販売、商品名『ファイントース』）

7.5 質量部

部分精製ローヤルゼリーの凍結乾燥粉末

1.5 質量部

マルチトール

0.8 質量部

L-トリプトファン

0.2 質量部

### 【0088】

本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示す抗アレルギー剤である。本品は、まろやかな甘味を示すので、日常的に利用する健康食品としても有用である。

### 【0089】

#### 【実施例 4】

### <健康飲料>

無水結晶マルトース（（株）林原商事販売、商品名『ファイントース』）500 質量部、実施例 3 の抗アレルギー剤 100 質量部、粉末卵黄 190 質量部、脱脂粉乳 200 質量部、塩化ナトリウム 4.4 質量部、塩化カリウム 1.85 質量部、硫酸マグネシウム 4 質量部、チアミン 0.01 質量部、アスコルビン酸ナトリウム 0.1 質量部、ビタミン E アセテート 0.6 質量部及びニコチン酸アミド 0.04 質量部からなる配合物を調製した。この配合物 25 質量部を精製水 150 質量部に均一に分散・溶解させ、150 g ずつ褐色ガラス瓶に封入した。

### 【0090】



本品は、抗アレルギー作用を安定して示す上、栄養源が補足されているので、健康維持、成長促進、アレルギーの予防、症状の緩和、治療の促進などを目的とする健康飲料として有利に利用できる。なお、本品は、ヒトのみならず、家畜などの動物のための経口摂取又は経管投与用組成物としても有利に利用できる。

#### 【0091】

##### 【実施例5】

###### ＜チューインガム＞

ガムベース3質量部を柔らかくなる程度に加熱溶解し、これに無水結晶マルチトール（株式会社林原商事販売、商品名『結晶マビット』）2質量部とキシリトール2質量部及び実施例2で得た抗アレルギー剤4質量部とを加え、更に適量の香料と着色料とを混合した。常法によってロールにより練り合わせている間に実験3-2の方法で得たRJP70を0.5質量部加え、更に練り合わせた後、成形、包装して製品を得た。

#### 【0092】

本品はテクスチャー、呈味、風味良好であり、抗アレルギー作用をも有するため、日常的に利用するチューインガムとして有利に利用できる。

#### 【0093】

##### 【実施例6】

###### ＜皮膚外用クリーム＞

以下の成分を、以下の配合にしたがって、常法により加熱しつつ混合した。

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリセリン	2.0質量部
自己乳化型モノステアリン酸グリセリン	5.0質量部
ベヘニン酸エイコサニル	1.0質量部
流動パラフィン	1.9質量部
トリオクタン酸トリメチロールプロパン	10.0質量部

#### 【0094】

上記の混合物に、抗アレルギー剤を除く以下の成分を以下の配合にしたがって添加・混合し、30℃以下にまで冷却した後に、さらに抗アレルギー剤を以下の

配合で加え、ホモジナイザーにより乳化して、皮膚外用クリームを製造した。

1, 3-ブチレングリコール	5.0 質量部
乳酸ナトリウム液	10.0 質量部
パラオキシ安息香酸メチル	0.1 質量部
モモ葉エキス	1.5 質量部
精製水	62.2 質量部
実施例 1 の方法で得た抗アレルギー剤粉末	1.0 質量部

#### 【0095】

本クリームは、優れた保湿性を示す上、アトピー性皮膚炎などのアレルギー症状を緩和するので、皮膚外用クリームとして有用である。

#### 【0096】

##### 【実施例 7】

##### <液剤>

生理食塩水に実験 3-2 の方法で精製し、実験 3-3 で物理化学的性質を明らかにしている RJP70 精製標品を濃度 0.1 質量%になるよう溶解した後、溶液を常法にしたがって精密ろ過により滅菌して液剤を得た。

#### 【0097】

本品は花粉症などのアレルギー疾患を緩和・治療するための注射剤、点眼剤、点鼻剤などとして有用である。

#### 【0098】

##### 【実施例 9】

##### <トローチ錠>

以下の成分を以下の配合で均一に混合した後、実施例 1 に準じて操作して、粉末の形態の本発明の抗アレルギー剤を調製した。調製後、実験 2 に準じて試験し、当該抗アレルギー剤が常温保存後も安定してサイトカインの産生を抑制し、抗アレルギー作用を示すことを確認した。

無水結晶マルトース（株式会社林原商事販売、商品名『ファイントース』）

	30 質量部
澱粉	30 質量部
実験3-2の方法で得たRJP70精製標品の凍結乾燥粉末	
	10 質量部
結晶セルロース	19 質量部
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	10 質量部
ステアリン酸マグネシウム	1 質量部

**【0099】**

当該抗アレルギー剤を、打錠機を用いて直径16mm、厚さ4mmの1錠あたり約1.0gのトローチ剤に成形した。本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示すトローチ剤である。本品は、まろやかな甘味を示すので、アトピー性アレルギーの予防、症状の緩和、治療の促進などを目的として日常的に利用する経口抗アトピー用トローチ剤として有用である。

**【0100】****【実施例10】****<錠剤>**

無水結晶マルトース（株式会社林原商事販売、商品名『ファイントース』）9質量部と、実験2の試験方法によりサイトカイン産生抑制活性が高レベルで認められた生ローヤルゼリー（ブラジル産）1質量部とを均一に混合し、この混合物を25℃で一夜静置した後、粉碎機を用いて粉末にした。この粉末を0.42mmφメッシュの篩を通したものを回収し、本発明の抗アレルギー剤を得た。

**【0101】**

当該抗アレルギー剤を打錠機を用いて1錠あたり約300mgの錠剤に成形した。本品は、常温保存の後も安定して抗アレルギー作用を示す、簡便に利用できかつ著効を示す抗アレルギー剤である。本品は、まろやかな甘味を示すので、アトピー性アレルギーの予防、症状の緩和、治療の促進などを目的として日常的に利用する経口抗アトピー用剤として有用である。

**【0102】**

## 【発明の効果】

以上説明したように、本発明は、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーがヒトを含む哺乳類に対して、顕著に抗体産生及びサイトカイン産生を抑制することにより抗アレルギー作用を示すという全く独自の知見に基づき、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーの抗アレルギー剤としての用途を開発したものである。本発明の抗アレルギー剤は、重篤な副作用の懸念がないので、ヒトを含む哺乳類が簡便かつ快適に、アトピー性疾患をはじめとするアレルギー疾患、自己免疫疾患の諸症状の予防・緩和・治療のために利用することができる。また、以上のような特長を有する本発明の抗アレルギー剤は、飲食物、化粧品、医薬品としての形態で利用することも有利に実施できる。

## 【0103】

本発明は、斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

## 【0104】

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Anti-allergic agent

<130> 10096101

<160> 12

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> *Apis mellifera*

&lt;400&gt; 1

Ala Ala Val Asn His Gln Arg Lys Ser Ala

1 5 10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Apis mellifera

&lt;400&gt; 2

Asn Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro Ile Leu His

1 5 10 15

Glu Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe

20 25

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 524

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Apis mellifera

&lt;400&gt; 3

Ala Ala Val Asn His Gln Arg Lys Ser Ala Asn Asn Leu Ala His Ser

1 5 10 15

Met Lys Val Ile Tyr Glu Trp Lys His Ile Asp Phe Asp Phe Gly Ser

20 25 30

Asp Glu Arg Arg Asp Ala Ala Ile Lys Ser Gly Glu Phe Asp His Thr

35 40 45

Lys Asn Tyr Pro Phe Asp Val Asp Arg Trp Arg Asp Lys Thr Phe Val

50 55 60

Thr Ile Glu Arg Asn Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Val Thr

65 70 75 80

Asn Lys Lys Gly Lys Gly Gly Pro Leu Leu Arg Pro Tyr Pro Asp Trp  
85 90 95

Ser Phe Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Phe Lys  
100 105 110

Ile Ala Val Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu  
115 120 125

Val Asn Asn Asn Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp  
130 135 140

Leu Lys Thr Ser Lys Leu Val Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asn Ile  
145 150 155 160

Ala Val Asn Ala Thr Thr Gly Met Gly Glu Leu Val Ser Leu Ala Val  
165 170 175

Gln Ala Ile Asp Arg Thr Asn Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys  
180 185 190

Gly Glu Gly Leu Ile Met Tyr Gln Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg  
195 200 205

Leu Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Arg Tyr Thr Lys Leu Thr  
210 215 220

Val Ala Gly Glu Ser Phe Thr Val Lys Asn Gly Ile Cys Gly Ile Ala  
225 230 235 240

Leu Ser Pro Val Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Leu Ser Ser His  
245 250 255

Gly Leu Tyr Tyr Val Asp Thr Glu Gln Phe Arg Asn Pro Gln Tyr Glu  
260 265 270

Glu Asn Asn Val Gln Tyr Glu Gly Ser Gln Asp Ile Leu Asn Thr Gln  
275 280 285

Ser Phe Gly Lys Val Val Ser Lys Asn Gly Val Leu Phe Leu Gly Leu  
290 295 300

Val Gly Asn Ser Gly Ile Ala Cys Val Asn Glu His Gln Val Leu Gln

305 310 315 320  
Arg Glu Ser Phe Asp Val Val Ala Gln Asn Glu Glu Thr Leu Gln Met  
325 330 335  
Ile Val Ser Met Lys Ile Met Glu Asn Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile  
340 345 350  
Asn Asp Pro Glu Gly Asn Glu Tyr Met Leu Ala Leu Ser Asn Arg Met  
355 360 365  
Gln Lys Ile Ile Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asn Asp Val Asn Phe Arg  
370 375 380  
Ile Leu Gly Ala Asn Val Asp Asp Leu Met Arg Asn Thr Arg Cys Gly  
385 390 395 400  
Arg Tyr His Asn Gln Asn Ala Gly Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn  
405 410 415  
Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asn Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala  
420 425 430  
Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Arg Gln Asn Asp Asn  
435 440 445  
Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg  
450 455 460  
Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Gly Asn Lys Gln  
465 470 475 480  
Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Arg Asn  
485 490 495  
Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Gln Asn Asn Gln Asn Asp Asn Asn Arg  
500 505 510  
Asn Asp Asn Gln Val His His Ser Ser Lys Leu His  
515 520

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 413

&lt;212&gt; PRT

<213> *Apis mellifera*

&lt;400&gt; 4

Asn Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro Ile Leu His

1 5 10 15

Glu Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg Gln

20 25 30

Asp Ala Ile Leu Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr Lys Asn Asn Tyr Pro Ser

35 40 45

Asp Ile Asp Gln Trp His Asp Lys Ile Phe Val Thr Met Leu Arg Tyr

50 55 60

Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys Lys Val Gly Asp

65 70 75 80

Gly Gly Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys Tyr

85 90 95

Asp Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys Leu Ala Ile Asp Lys

100 105 110

Cys Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Thr Gln

115 120 125

Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr Thr Ser Gln

130 135 140

Leu Leu Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asp Val Ala Val Asn Ala Thr

145 150 155 160

Thr Gly Lys Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ala Val Gln Ser Leu Asp Cys

165 170 175

Asn Thr Asn Ser Asp Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Gly Glu

180 185 190

Gly Leu Ile Val Tyr His Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg Leu Thr



195	200	205
Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Lys Phe Thr Lys Met Thr Ile Asp		
210	215	220
Gly Glu Ser Tyr Thr Ala Gln Asp Gly Ile Ser Gly Met Ala Leu Ser		
225	230	235
Pro Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Val Ala Ser Thr Ser Leu		
245	250	255
Tyr Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Arg Thr Ser Asp Tyr Gln Gln Asn		
260	265	270
Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn Ile Leu Asp Thr Gln Ser Ser		
275	280	285
Ala Lys Val Val Ser Lys Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val Gly		
290	295	300
Asp Ser Ala Leu Gly Cys Trp Asn Glu His Arg Thr Leu Glu Arg His		
305	310	315
Asn Ile Arg Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln Met Ile Ala		
325	330	335
Ser Met Lys Ile Lys Glu Ala Xaa Pro His Val Pro Ile Phe Asp Arg		
340	345	350
Tyr Ile Asn Arg Glu Tyr Ile Leu Val Leu Ser Asn Lys Met Gln Lys		
355	360	365
Met Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg Ile Met		
370	375	380
Asn Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg Cys Glu Asn Pro		
385	390	395
Asp Asn Asp Arg Thr Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu		
405	410	

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1635

&lt;212&gt; DNA

<213> *Apis mellifera*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1635)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (61)..(1632)

&lt;400&gt; 5

atg aca aag tgg ttg ttg ctg gtg gtg tgc ctt ggt ata gct tgt caa 48

Met Thr Lys Trp Leu Leu Leu Val Val Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln

-20 -15 -10 -5

gat gta aca agc gca gct gtg aat cat caa aga aaa tct gca aat aat 96

Asp Val Thr Ser Ala Ala Val Asn His Gln Arg Lys Ser Ala Asn Asn

1 5 10

ttg gca cat tct atg aaa gtg atc tac gaa tgg aaa cac att gat ttt 144

Leu Ala His Ser Met Lys Val Ile Tyr Glu Trp Lys His Ile Asp Phe

15 20 25

gat ttc ggt agc gat gaa aga aga gat gct gcg att aaa tct ggc gaa 192

Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg Asp Ala Ala Ile Lys Ser Gly Glu

30 35 40

ttt gat cac aca aaa aat tat cct ttc gat gtg gac aga tgg cgt gat 240

Phe Asp His Thr Lys Asn Tyr Pro Phe Asp Val Asp Arg Trp Arg Asp

45 50 55 60

aag aca ttt gtc acc ata gaa agg aac aat ggt gta cct tct tct ttg 288

Lys Thr Phe Val Thr Ile Glu Arg Asn Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu

65

70

75

aac gtg gta act aat aaa aag ggc aaa ggt gga cct ctt cta cga cca 336

Asn Val Val Thr Asn Lys Lys Gly Lys Gly Gly Pro Leu Leu Arg Pro

80

85

90

tat cct gat tgg tcg ttt gcc aaa tac gaa gat tgc tct gga att gtg 384

Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Ile Val

95

100

105

agc gct ttc aaa att gcg gtc gac aaa ttt gac aga tta tgg gtt ctg 432

Ser Ala Phe Lys Ile Ala Val Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Val Leu

110

115

120

gac tca ggt ctt gtc aat aat aat caa cct atg tgc tct cca aaa ttg 480

Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Asn Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu

125

130

135

140

tta acc ttt gat ctg aaa acc tca aaa ttg gtt aag caa gtc gag ata 528

Leu Thr Phe Asp Leu Lys Thr Ser Lys Leu Val Lys Gln Val Glu Ile

145

150

155

cca cat aat att gcc gta aac gcc acc aca gga atg gga gaa tta gtt 576

Pro His Asn Ile Ala Val Asn Ala Thr Thr Gly Met Gly Glu Leu Val

160

165

170

tca cta gct gtt caa gct ata gat cgt acg aat act atg gtg tac ata 624  
Ser Leu Ala Val Gln Ala Ile Asp Arg Thr Asn Thr Met Val Tyr Ile  
175 180 185

gca gac gaa aaa ggc gaa ggt tta atc atg tat caa aac tcc gac gat 672  
Ala Asp Glu Lys Gly Glu Gly Leu Ile Met Tyr Gln Asn Ser Asp Asp  
190 195 200

tcc ttc cat cga ttg act tcc aat act ttc gat tac gat ccc aga tat 720  
Ser Phe His Arg Leu Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Arg Tyr  
205 210 215 220

acc aaa ttg aca gtc gct gga gaa agt ttc aca gtg aaa aat gga att 768  
Thr Lys Leu Thr Val Ala Gly Glu Ser Phe Thr Val Lys Asn Gly Ile  
225 230 235

tgt gga att gca ctt agt ccc gtg acg aac aat ctt tat tac agc cct 816  
Cys Gly Ile Ala Leu Ser Pro Val Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro  
240 245 250

ctc tct tct cac ggt ttg tat tat gtt gat acg gaa caa ttc agg aat 864  
Leu Ser Ser His Gly Leu Tyr Tyr Val Asp Thr Glu Gln Phe Arg Asn  
255 260 265

cca caa tat gaa gaa aat aac gtg caa tat gaa gga tct caa gat att 912  
Pro Gln Tyr Glu Glu Asn Asn Val Gln Tyr Glu Gly Ser Gln Asp Ile  
270 275 280

ttg aac act caa tca ttc ggt aaa gta gta tcg aaa aat ggc gtc ctt 960

Leu Asn Thr Gln Ser Phe Gly Lys Val Val Ser Lys Asn Gly Val Leu  
 285 290 295 300

ttc ttg gga ctc gtg ggt aat tca ggt att gcc tgc gtg aat gaa cat 1008  
 Phe Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Gly Ile Ala Cys Val Asn Glu His  
 305 310 315

caa gta ctt cag aga gaa agt ttt gat gtt gtc gct cag aat gaa gag 1056  
 Gln Val Leu Gln Arg Glu Ser Phe Asp Val Val Ala Gln Asn Glu Glu  
 320 325 330

aca ctt caa atg atc gtt agt atg aaa atc atg gaa aat ctt cca caa 1104  
 Thr Leu Gln Met Ile Val Ser Met Lys Ile Met Glu Asn Leu Pro Gln  
 335 340 345

tcc ggc aga att aat gat cct gaa ggc aat gaa tat atg ttg gct ttg 1152  
 Ser Gly Arg Ile Asn Asp Pro Glu Gly Asn Glu Tyr Met Leu Ala Leu  
 350 355 360

agt aac aga atg caa aaa ata ata aac aat gat ttt aat ttc aac gac 1200  
 Ser Asn Arg Met Gln Lys Ile Ile Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asn Asp  
 365 370 375 380

gta aat ttc cga att ttg ggt gcg aat gta gat gac tta atg aga aac 1248  
 Val Asn Phe Arg Ile Leu Gly Ala Asn Val Asp Asp Leu Met Arg Asn  
 385 390 395

act cgt tgc gga aga tat cac aat cag aat gct ggc aat cag aat gct 1296  
 Thr Arg Cys Gly Arg Tyr His Asn Gln Asn Ala Gly Asn Gln Asn Ala

400

405

410

gac aat cag aat gct gac aat cag aat gct aac aat cag aat gct gat 1344

Asp Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asn Asn Gln Asn Ala Asp

415

420

425

aat cag aat gct aac aaa caa aat ggt aat aga caa aat gat aac aga 1392

Asn Gln Asn Ala Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Arg

430

435

440

cag aat gat aac aag caa aat ggt aac aga cag aat gat aac aag caa 1440

Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln

445

450

455

460

aat ggt aac aga cag aat gat aac aag caa aat ggt aac aga caa aat 1488

Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn

465

470

475

ggt aac aaa cag aat gat aac aag caa aat ggt aac aga cag aat gat 1536

Gly Asn Lys Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp

480

485

490

aac aag agg aat ggt aac agg caa aat gat aat caa aat aat cag aat 1584

Asn Lys Arg Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Gln Asn Asn Gln Asn

495

500

505

gat aat aat cga aat gat aat caa gtt cat cat tct tca aaa tta cat 1632

Asp Asn Asn Arg Asn Asp Asn Gln Val His His Ser Ser Lys Leu His

510

515

520

taa

1635

525

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1245

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Apis mellifera

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1245)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; mat\_peptide

&lt;222&gt; (4)..(1242)

&lt;400&gt; 6

atg aac att ctt cga gga gag tct tta aac aaa tca tta ccc atc ctt 48

Met Asn Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro Ile Leu

-1 1 5 10 15

cac gaa tgg aaa ttc ttt gat tat gat ttc ggt agc gat gaa aga aga 96

His Glu Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg

20 25 30

caa gat gca att cta tct ggc gaa tac gac tac aag aat aat tat cca 144

Gln Asp Ala Ile Leu Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr Lys Asn Asn Tyr Pro

35 40 45

tcc gac att gac caa tgg cat gat aag att ttt gtc acc atg ctg aga 192

Ser Asp Ile Asp Gln Trp His Asp Lys Ile Phe Val Thr Met Leu Arg  
 50 55 60

tac aat ggc gta cct tcc tct ttg aac gtg ata tct aaa aag gtc ggt 240  
 Tyr Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys Lys Val Gly  
 65 70 75

gat ggt ggt cct ctt cta caa cct tat ccc gat tgg tcg ttt gct aaa 288  
 Asp Gly Gly Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys  
 80 85 90 95

tat gac gat tgc tct gga atc gtg agc gcc tca aaa ctt gcg atc gac 336  
 Tyr Asp Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys Leu Ala Ile Asp  
 100 105 110

aaa tgc gac aga ttg tgg gtt ctg gac tca ggt ctt gtc aat aat act 384  
 Lys Cys Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Thr  
 115 120 125

caa ccc atg tgt tct cca aaa ctg ctc acc ttt gat ctg act acc tcg 432  
 Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr Thr Ser  
 130 135 140

caa ttg ctc aag caa gtt gaa ata cca cat gat gtt gcc gta aat gcc 480  
 Gln Leu Leu Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asp Val Ala Val Asn Ala  
 145 150 155

act aca gga aag gga aga tta tca tct cta gct gtt caa tct tta gat 528  
 Thr Thr Gly Lys Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ala Val Gln Ser Leu Asp



160

165

170

175

tgc aat aca aat agc gat act atg gtg tac ata gca gac gag aaa ggt 576

Cys Asn Thr Asn Ser Asp Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Gly

180

185

190

gaa ggt tta atc gtg tat cat aat tct gat gat tcc ttc cat cga ttg 624

Glu Gly Leu Ile Val Tyr His Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg Leu

195

200

205

act tcc aac act ttc gat tac gat cct aaa ttt acc aaa atg acg atc 672

Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Lys Phe Thr Lys Met Thr Ile

210

215

220

gat gga gaa agt tac aca gcc caa gat gga att tct gga atg gct ctt 720

Asp Gly Glu Ser Tyr Thr Ala Gln Asp Gly Ile Ser Gly Met Ala Leu

225

230

235

agt ccc atg act aac aat ctc tat tac agt cct gta gct tcc acc agt 768

Ser Pro Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Val Ala Ser Thr Ser

240

245

250

255

ttg tat tat gtt aac acg gaa caa ttc aga aca tcc gat tat caa cag 816

Leu Tyr Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Arg Thr Ser Asp Tyr Gln Gln

260

265

270

aat gac ata cat tac gaa gga gtc caa aat att ttg gat acc caa tcg 864

Asn Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn Ile Leu Asp Thr Gln Ser

275

280

285

tcc gct aaa gta gta tca aag agt ggc gtt ctc ttc ttc gga ttg gtg 912

Ser Ala Lys Val Val Ser Lys Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val

290

295

300

ggc gat tca gct ctt ggc tgc tgg aac gaa cat cga aca ctt gaa aga 960

Gly Asp Ser Ala Leu Gly Cys Trp Asn Glu His Arg Thr Leu Glu Arg

305

310

315

cac aat atc cgt acc gtc gct caa agt gat gag act ctt caa atg atc 1008

His Asn Ile Arg Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln Met Ile

320

325

330

335

gct agc atg aag att aag gaa gct ctt cca cac gtg cct ata ttc gat 1056

Ala Ser Met Lys Ile Lys Glu Ala Leu Pro His Val Pro Ile Phe Asp

340

345

350

agg tat ata aac cgt gaa tac ata ttg gtt tta agt aac aaa atg caa 1104

Arg Tyr Ile Asn Arg Glu Tyr Ile Leu Val Leu Ser Asn Lys Met Gln

355

360

365

aaa atg gtg aat aat gac ttc aac ttc gac gat gtt aac ttc aga att 1152

Lys Met Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg Ile

370

375

380

atg aac gcg aat gta aac gaa ttg ata ttg aac act cgt tgc gaa aat 1200

Met Asn Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg Cys Glu Asn

385

390

395

ccc gat aat gat cga aca cct ttc aaa att tca atc cat ttg taa 1245

Pro Asp Asn Asp Arg Thr Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu

400

405

410

<210> 7

<211> 1830

<212> DNA

<213> *Apis mellifera*

<220>

<221> CDS

<222> (35)..(1669)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (35)..(94)

<220>

<221> mat\_peptide

<222> (95)..(1666)

<400> 7

gtcaattgga aaatatctgt attatcctag aaaa atg aca aag tgg ttg ttg ctg 55

Met Thr Lys Trp Leu Leu Leu

-20

-15

gtg gtg tgc ctt ggt ata gct tgt caa gat gta aca agc gca gct gtg 103

Val Val Cys Leu Gly Ile Ala Cys Gln Asp Val Thr Ser Ala Ala Val

-10

-5

1

aat cat caa aga aaa tct gca aat aat ttg gca cat tct atg aaa gtg 151

Asn His Gln Arg Lys Ser Ala Asn Asn Leu Ala His Ser Met Lys Val

5

10

15

atc tac gaa tgg aaa cac att gat ttt gat ttc ggt agc gat gaa aga 199  
Ile Tyr Glu Trp Lys His Ile Asp Phe Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg  
20 25 30 35

aga gat gct gcg att aaa tct ggc gaa ttt gat cac aca aaa aat tat 247  
Arg Asp Ala Ala Ile Lys Ser Gly Glu Phe Asp His Thr Lys Asn Tyr  
40 45 50

cct ttc gat gtg gac aga tgg cgt gat aag aca ttt gtc acc ata gaa 295  
Pro Phe Asp Val Asp Arg Trp Arg Asp Lys Thr Phe Val Thr Ile Glu  
55 60 65

agg aac aat ggt gta cct tct tct ttg aac gtg gta act aat aaa aag 343  
Arg Asn Asn Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Val Thr Asn Lys Lys  
70 75 80

ggc aaa ggt gga cct ctt cta cga cca tat cct gat tgg tcg ttt gcc 391  
Gly Lys Gly Gly Pro Leu Leu Arg Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala  
85 90 95

aaa tac gaa gat tgc tct gga att gtg agc gct ttc aaa att gcg gtc 439  
Lys Tyr Glu Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Phe Lys Ile Ala Val  
100 105 110 115

gac aaa ttt gac aga tta tgg gtt ctg gac tca ggt ctt gtc aat aat 487  
Asp Lys Phe Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn  
120 125 130

aat caa cct atg tgc tct cca aaa ttg tta acc ttt gat ctg aaa acc 535  
Asn Gln Pro Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Lys Thr  
135 140 145

tca aaa ttg gtt aag caa gtc gag ata cca cat aat att gcc gta aac 583  
Ser Lys Leu Val Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asn Ile Ala Val Asn  
150 155 160

gcc acc aca gga atg gga gaa tta gtt tca cta gct gtt caa gct ata 631  
Ala Thr Thr Gly Met Gly Glu Leu Val Ser Leu Ala Val Gln Ala Ile  
165 170 175

gat cgt acg aat act atg gtg tac ata gca gac gaa aaa ggc gaa ggt 679  
Asp Arg Thr Asn Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Gly Glu Gly  
180 185 190 195

tta atc atg tat caa aac tcc gac gat tcc ttc cat cga ttg act tcc 727  
Leu Ile Met Tyr Gln Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg Leu Thr Ser  
200 205 210

aat act ttc gat tac gat ccc aga tat acc aaa ttg aca gtc gct gga 775  
Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Arg Tyr Thr Lys Leu Thr Val Ala Gly  
215 220 225

gaa agt ttc aca gtg aaa aat gga att tat gga att gca ctt agt ccc 823  
Glu Ser Phe Thr Val Lys Asn Gly Ile Tyr Gly Ile Ala Leu Ser Pro  
230 235 240

gtg acg aac aat ctt tat tac agc cct ctt ctt tct cac ggt ttg tat 871

Val Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Leu Leu Ser His Gly Leu Tyr  
 245 250 255

tat gtt gat acg gaa caa ttc agc aat cca caa tat gaa gaa aat aac 919  
 Tyr Val Asp Thr Glu Gln Phe Ser Asn Pro Gln Tyr Glu Glu Asn Asn  
 260 265 270 275

gtg caa tat gaa gga tct caa gat att ttg aac act caa tca ttc ggt 967  
 Val Gln Tyr Glu Gly Ser Gln Asp Ile Leu Asn Thr Gln Ser Phe Gly  
 280 285 290

aaa gta gta tcg aaa aat ggc gtc ctt ttc ttg gga ctc gtg ggt aat 1015  
 Lys Val Val Ser Lys Asn Gly Val Leu Phe Leu Gly Leu Val Gly Asn  
 295 300 305

tca ggt att gcc tgc gtg aat gaa cat caa gta ctt cag aga gaa agt 1063  
 Ser Gly Ile Ala Cys Val Asn Glu His Gln Val Leu Gln Arg Glu Ser  
 310 315 320

ttt gat gtt gtc gct cag aat gaa gag aca ctt caa atg atc gtt agt 1111  
 Phe Asp Val Val Ala Gln Asn Glu Glu Thr Leu Gln Met Ile Val Ser  
 325 330 335

atg aaa atc atg gaa aat ctt cca caa tcc ggc aga att aat gat cct 1159  
 Met Lys Ile Met Glu Asn Leu Pro Gln Ser Gly Arg Ile Asn Asp Pro  
 340 345 350 355

gaa ggc aat gaa tat atg ttg gct ttg agt aac aga atg caa aaa ata 1207  
 Glu Gly Asn Glu Tyr Met Leu Ala Leu Ser Asn Arg Met Gln Lys Ile

360

365

370

ata aac aat gat ttt aat ttc aac gac gta aat ttc cga att ttg ggt 1255

Ile Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asn Asp Val Asn Phe Arg Ile Leu Gly

375

380

385

gcg aat gta gat gac tta atg aga aac act cgt tgc gga aga tat cac 1303

Ala Asn Val Asp Asp Leu Met Arg Asn Thr Arg Cys Gly Arg Tyr His

390

395

400

aat cag aat gct ggc aat cag aat gct gac aat cag aat gct gac aat 1351

Asn Gln Asn Ala Gly Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asp Asn

405

410

415

cag aat gct aac aat cag aat gct gat aat cag aat gct aac aaa caa 1399

Gln Asn Ala Asn Asn Gln Asn Ala Asp Asn Gln Asn Ala Asn Lys Gln

420

425

430

435

aat ggt aat aga caa aat gat aac aga cag aat gat aac aag caa aat 1447

Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn

440

445

450

ggt aac aga cag aat gat aac aag caa aat ggt aac aga cag aat gat 1495

Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp

455

460

465

aac aag caa aat ggt aac aga caa aat ggt aac aaa cag aat gat aac 1543

Asn Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Gly Asn Lys Gln Asn Asp Asn

470

475

480

aag caa aat ggt aac aga cag aat gat aac aag agg aat ggt aac agg 1591

Lys Gln Asn Gly Asn Arg Gln Asn Asp Asn Lys Arg Asn Gly Asn Arg

485

490

495

caa aat gat aat caa aat aat cag aat gat aat aat cga aat gat aat 1639

Gln Asn Asp Asn Gln Asn Asn Gln Asn Asp Asn Asn Arg Asn Asp Asn

500

505

510

515

caa gtt cat cat tct tca aaa tta cat taa atcaatcaat tatcaattaa aat 1692

Gln Val His His Ser Ser Lys Leu His

520

caattaatta agatgtaaat caaattatatt tttaaaatat tttttcgatg taaacaaaat 1752

tttgtaaaat ctttcattat attataaata aataaaataa atatcgtttt cgcataaaaa 1812

aaaaaaaaa aaaaaaaaa

1830

<210> 8

<211> 1430

<212> DNA

<213> Apis mellifera

<220>

<221> CDS

<222> (46)..(1341)

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (46)..(102)

<220>

<221> mat\_peptide



&lt;222&gt; (103)..(1341)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; (1134)

&lt;223&gt; n=a or g or c or t

&lt;400&gt; 8

ttcacgtaca atattccatt gcttcgttac tcgcagctta gaaaa atg aca aga ttg 57

Met Thr Arg Leu

-19

ttt atg ctg gta tgc ctt ggc ata gtt tgt caa ggt acg aca ggc aac 105

Phe Met Leu Val Cys Leu Gly Ile Val Cys Gln Gly Thr Thr Gly Asn

-15 -10 -5 1

att ctt cga gga gag tct tta aac aaa tca tta ccc atc ctt cac gaa 153

Ile Leu Arg Gly Glu Ser Leu Asn Lys Ser Leu Pro Ile Leu His Glu

5 10 15

tgg aaa ttc ttt gat tat gat ttc ggt agc gat gaa aga aga caa gat 201

Trp Lys Phe Phe Asp Tyr Asp Phe Gly Ser Asp Glu Arg Arg Gln Asp

20 25 30

gca att cta tct ggc gaa tac gac tac aag aat aat tat cca tcc gac 249

Ala Ile Leu Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Asp

35 40 45

att gac caa tgg cat gat aag att ttt gtc acc atg ctg aga tac aat 297

Ile Asp Gln Trp His Asp Lys Ile Phe Val Thr Met Leu Arg Tyr Asn

50 55 60 65

ggc gta cct tcc tct ttg aac gtg ata tct aaa aag gtc ggt gat ggt 345

Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys Lys Val Gly Asp Gly

70

75

80

ggt cct ctt cta caa cct tat ccc gat tgg tcg ttt gct aaa tat gac 393

Gly Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala Lys Tyr Asp

85

90

95

gat tgc tct gga atc gtg agc gcc tca aaa ctt gcg atc gac aaa tgc 441

Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys Leu Ala Ile Asp Lys Cys

100

105

110

gac aga ttg tgg gtt ctg gac tca ggt ctt gtc aat aat act caa ccc 489

Asp Arg Leu Trp Val Leu Asp Ser Gly Leu Val Asn Asn Thr Gln Pro

115

120

125

atg tgt tct cca aaa ctg ctc acc ttt gat ctg act acc tcg caa ttg 537

Met Cys Ser Pro Lys Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr Thr Ser Gln Leu

130

135

140

145

ctc aag caa gtt gaa ata cca cat gat gtt gcc gta aat gcc act aca 585

Leu Lys Gln Val Glu Ile Pro His Asp Val Ala Val Asn Ala Thr Thr

150

155

160

gga aag gga aga tta tca tct cta gct gtt caa tct tta gat tgc aat 633

Gly Lys Gly Arg Leu Ser Ser Leu Ala Val Gln Ser Leu Asp Cys Asn

165

170

175

aca aat agc gat act atg gtg tac ata gca gac gag aaa ggt gaa ggt 681  
Thr Asn Ser Asp Thr Met Val Tyr Ile Ala Asp Glu Lys Gly Glu Gly  
180 185 190

tta atc gtg tat cat aat tct gat gat tcc ttc cat cga ttg act tcc 729  
Leu Ile Val Tyr His Asn Ser Asp Asp Ser Phe His Arg Leu Thr Ser  
195 200 205

aac act ttc gat tac gat cct aaa ttt acc aaa atg acg atc gat gga 777  
Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Pro Lys Phe Thr Lys Met Thr Ile Asp Gly  
210 215 220 225

gaa agt tac aca gcc caa gat gga att tct gga atg gct ctt agt ccc 825  
Glu Ser Tyr Thr Ala Gln Asp Gly Ile Ser Gly Met Ala Leu Ser Pro  
230 235 240

atg act aac aat ctc tat tac agt cct gta gct tcc acc agt ttg tat 873  
Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Val Ala Ser Thr Ser Leu Tyr  
245 250 255

tat gtt aac acg gaa caa ttc aga aca tcc gat tat caa cag aat gac 921  
Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Arg Thr Ser Asp Tyr Gln Gln Asn Asp  
260 265 270

ata cat tac gaa gga gtc caa aat att ttg gat acc caa tcg tcc gct 969  
Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn Ile Leu Asp Thr Gln Ser Ser Ala  
275 280 285

aaa gta gta tca aag agt ggc gtt ctc ttc ttc gga ttg gtg ggc gat 1017

Lys Val Val Ser Lys Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val Gly Asp  
 290 295 300 305

tca gct ctt ggc tgc tgg aac gaa cat cga aca ctt gaa aga cac aat 1065  
 Ser Ala Leu Gly Cys Trp Asn Glu His Arg Thr Leu Glu Arg His Asn  
 310 315 320

atc cgt acc gtc gct caa agt gat gag act ctt caa atg atc gct agc 1113  
 Ile Arg Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln Met Ile Ala Ser  
 325 330 335

atg aag att aag gaa gct ctn cca cac gtg cct ata ttc gat agg tat 1161  
 Met Lys Ile Lys Glu Ala Leu Pro His Val Pro Ile Phe Asp Arg Tyr  
 340 345 350

ata aac cgt gaa tac ata ttg gtt tta agt aac aaa atg caa aaa atg 1209  
 Ile Asn Arg Glu Tyr Ile Leu Val Leu Ser Asn Lys Met Gln Lys Met  
 355 360 365

gtg aat aat gac ttc aac ttc gac gat gtt aac ttc aga att atg aac 1257  
 Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg Ile Met Asn  
 370 375 380 385

gcg aat gta aac gaa ttg ata ttg aac act cgt tgc gaa aat ccc gat 1305  
 Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg Cys Glu Asn Pro Asp  
 390 395 400

aat gat cga aca cct ttc aaa att tca atc cat ttg taa aatctgagtt tt 1356  
 Asn Asp Arg Thr Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu

405

410

ttgttatata ttaaataattt ctcgaaattt ctttccatta tgaatgtata aaataaatat 1416  
tgttttcgca taat 1430

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide as PCR sense primer

&lt;400&gt; 9

cctagaaaaa tgacaaagtg gttg 24

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide as PCR anti-sense primer

&lt;400&gt; 10

gattttacaa aattttgttt acatcg 26

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide as PCR sense primer

&lt;400&gt; 11

gctacatatg aacattcttc gaggagag

28

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide as PCR anti-sense primer

&lt;400&gt; 12

gctaggatcc ctattacaaa tggattgaaa ttttg

35

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

ローヤルゼリーの水溶性画分を、D E A E - 5 P W ゲルを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供した際の活性蛋白質の溶出を示すクロマトグラムである。

## 【符号の説明】

- 相対 I L - 2 産生率
- 相対 I L - 4 産生率
- △ 相対細胞増殖率
- 1 活性蛋白質 1 溶出フラクション
- 2 活性蛋白質 2 溶出フラクション

## 【図 2】

活性蛋白質 1 画分を、ヘパリン (H e p a r i n) - 5 P W ゲルを用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供した際の活性蛋白質の溶出を示すクロマトグラムである。

## 【符号の説明】

- 相対 I L - 2 産生率

● 相対 I L - 4 産生率

△ 相対細胞増殖率

1 活性蛋白質 1 - 1 溶出フラクション

2 活性蛋白質 1 - 2 溶出フラクション

【図 3】

ローヤルゼリー又は R J P 7 0 を O V A / A l u m で免疫した雌性 B A L B / c マウスに腹腔内投与した際の、血清中の抗 O V A - I g E 抗体価を測定した結果を示す図である。

【符号の説明】

● 各個体 ( 5 匹 ) のデータ

— 平均値

\* 危険率 5 % 以下で有意差を示すデータ

【図 4】

ローヤルゼリー又は R J P 7 0 を O V A / A l u m で免疫した雌性 B A L B / c マウスに腹腔内投与した際の、血清中の抗 O V A - I g G 1 抗体価を測定した結果を示す図である。

【符号の説明】

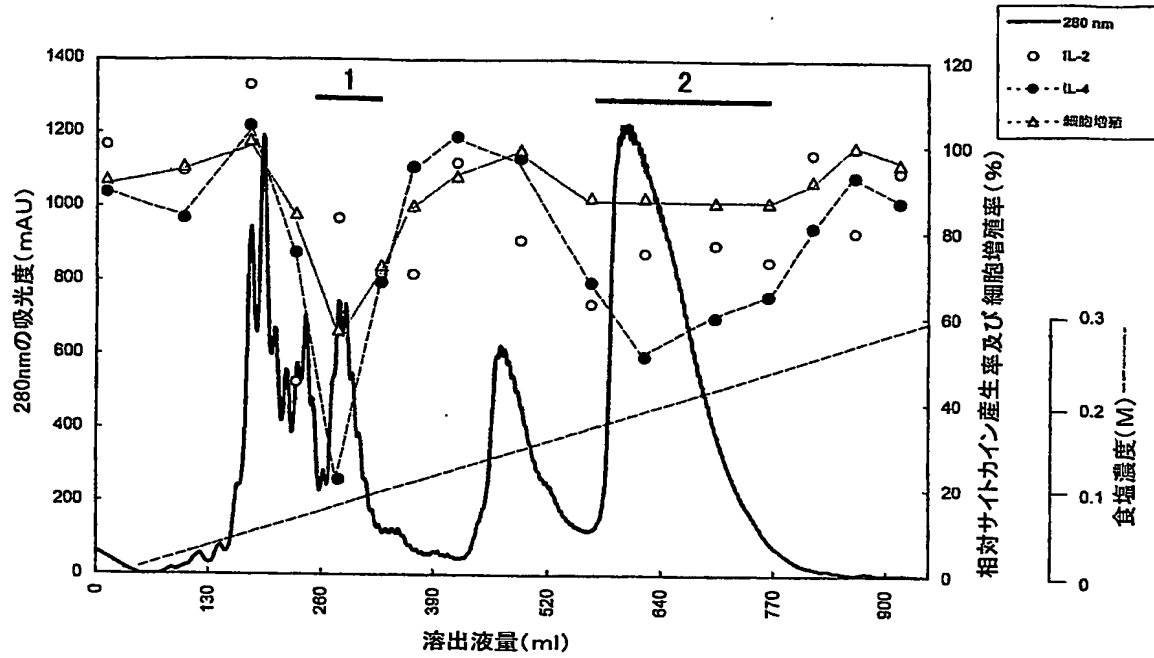
● 各個体 ( 5 匹 ) のデータ

— 平均値

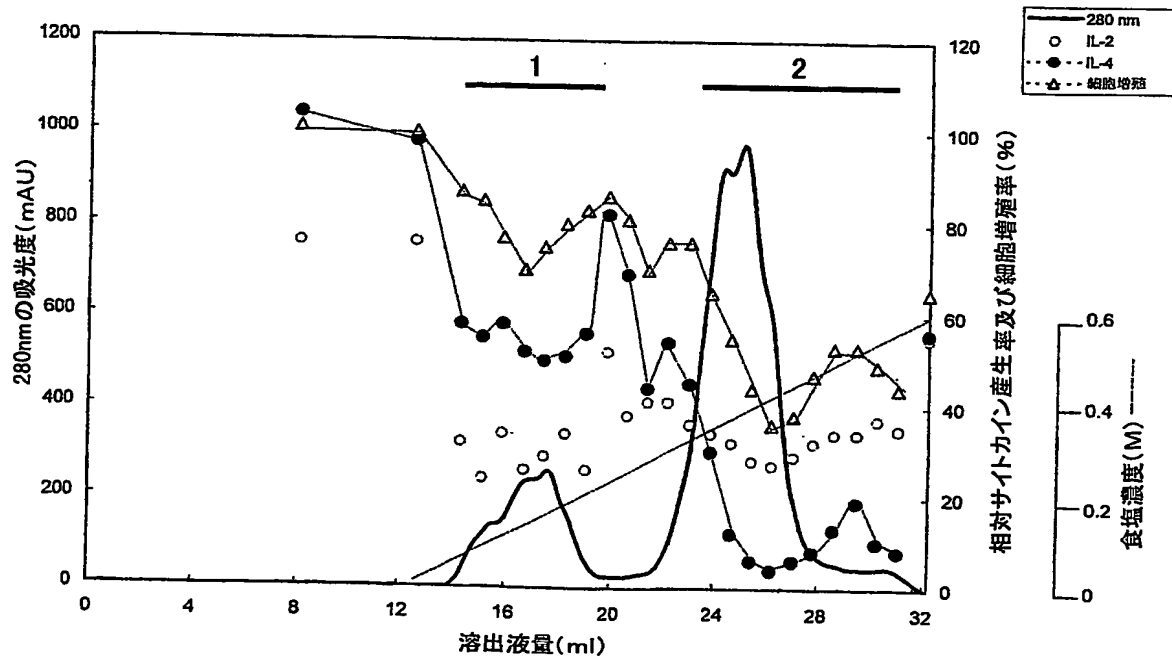
\* 危険率 5 % 以下で有意差を示すデータ

【書類名】 図面

【図 1】

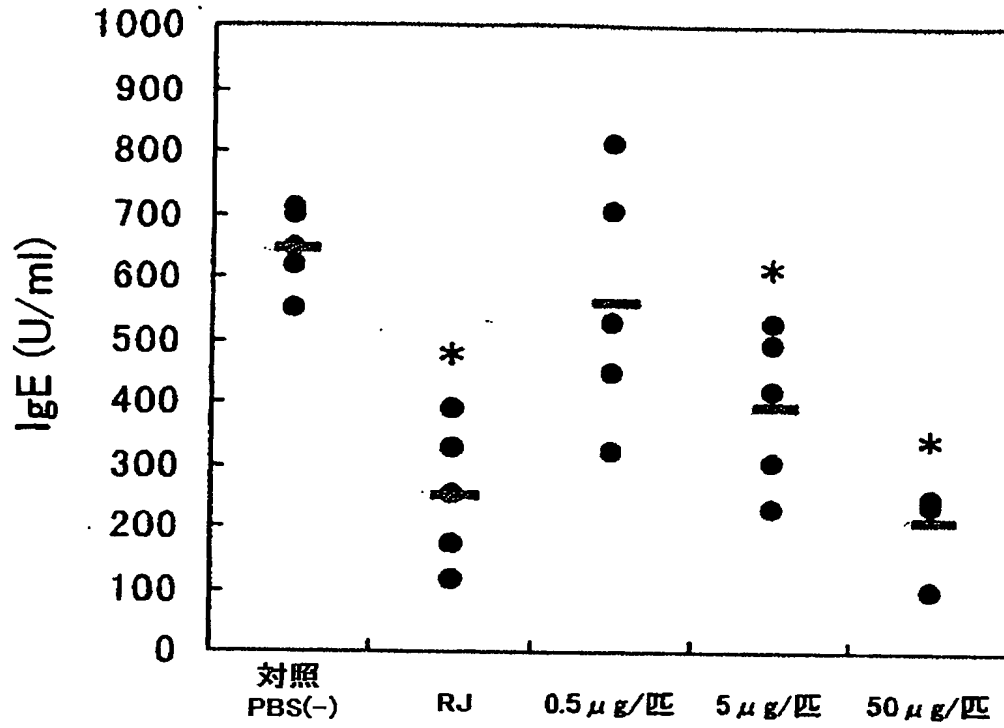


【図 2】

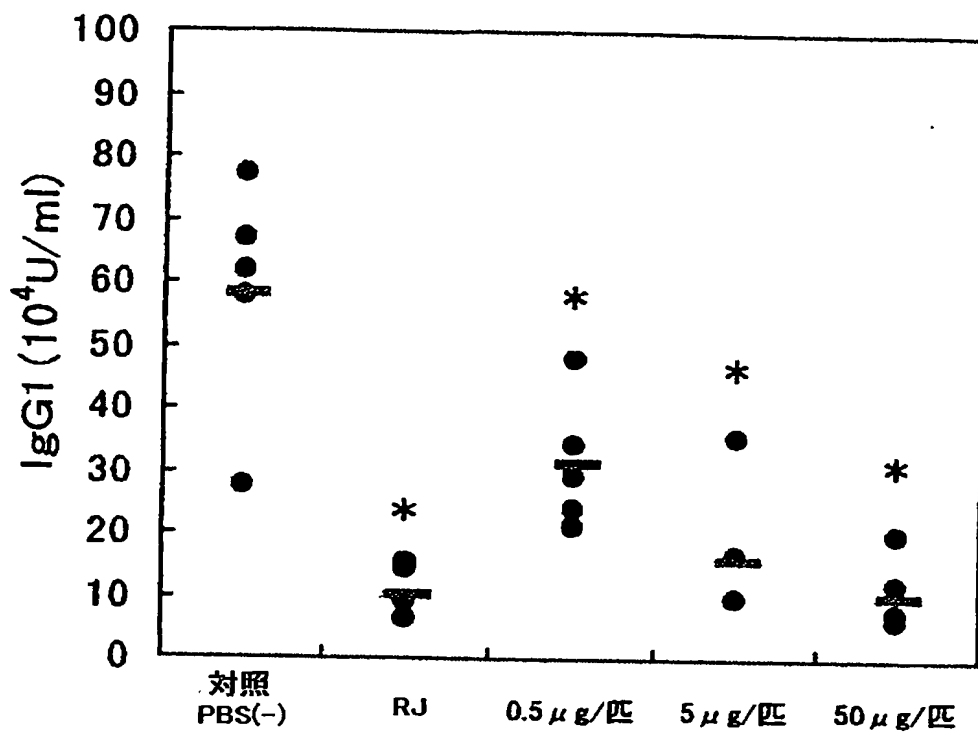




【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 重篤な副作用を惹起することなくアレルギー疾患に伴う諸症状を効果的に緩和する抗アレルギー剤を提供する。

【解決手段】 有効成分として、ローヤルゼリー又は精製ローヤルゼリーを含んでなる抗アレルギー剤を提供することにより解決する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-022776
受付番号	50300151257
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 2月 4日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 1月30日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-022776

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000251141]

- |          |                  |
|----------|------------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月31日      |
| [変更理由]   | 新規登録             |
| 住 所      | 岡山県岡山市東古松4丁目9番8号 |
| 氏 名      | 林原 健             |
| 2. 変更年月日 | 1998年10月21日      |
| [変更理由]   | 住所変更             |
| 住 所      | 岡山県岡山市東古松4丁目9番8号 |
| 氏 名      | 林原 健             |